

Aus der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Bruno Reichart

Verlängertes Überleben von Pavianen unter moderater  
Immunsuppression nach orthotoper Xenotransplantation hDAF-  
transgener Schweineherzen

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sebastian Georg Alexander Michel

aus

München

2008

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Bruno Reichart

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Katja Anslinger

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Florian Löhe

Prof. Dr. med. Hans-Gustav Klobeck

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

PD Dr. med. Ulrike Brandl

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr.h.c. M. Reiser, FACR

Tag der mündlichen Prüfung:

04.12.2008

1. EINLEITUNG .....	5
1.1. Problem des Organspendermangels in der Transplantationsmedizin .....	5
1.2. Begriffsklärung und Geschichte der klinischen Xeno-Herztransplantation.....	7
1.3. Das Schwein als Organspender .....	9
1.4. Formen der Abstoßungsreaktion nach Xenotransplantation und deren Therapieansätze .	11
1.4.1. Hyperakute Abstoßung.....	11
1.4.2. Akut-vaskuläre (humorale) Abstoßung / akut-zelluläre Abstoßung .....	15
1.4.3. Chronische Abstoßung .....	18
1.5. Fragestellung .....	20
2. MATERIAL UND METHODEN .....	21
2.1. Spendertiere.....	21
2.2. Empfängertiere .....	21
2.3. Technik der orthotopen Herztransplantation.....	21
2.3.1. Spenderoperation.....	21
2.3.2. Empfängeroperation .....	25
2.4. Postoperative Überwachung und Therapie .....	32
2.5. Immunsuppressive Therapie .....	33
2.6. Spezielle Untersuchungen zur Diagnose einer Abstoßungsreaktion.....	38
2.6.1. Zytoimmunologisches Monitoring .....	38
2.6.2. Anti-Schwein-Antikörper-Hämolyse-Test .....	38
2.6.3. Anti- $\alpha$ -Gal-Antikörper-ELISA.....	39
2.7. Bestimmung der Interleukin-8-Spiegel .....	40
2.8. Bestimmung der MCP-1-Spiegel .....	41
2.9. Bestimmung der TNF- $\alpha$ -Spiegel .....	41
2.10. Gruppeneinteilung nach Immunsuppressionsschema .....	41
2.11. Endpunkte der Studie .....	42
2.12. Sektion.....	43
2.13. Pathologie.....	43
3. ERGEBNISSE.....	45
3.1. Überlebenszeiten und Todesursachen .....	45
3.2. Gewichte.....	48
3.3. hDAF-Expression auf dem Endothel .....	49
3.4. Anti- $\alpha$ -Gal-Antikörper-Titer .....	49
3.5. Anti-Schwein-Antikörper-Titer.....	52
3.6. Zytoimmunologisches Monitoring.....	53
3.7. Spiegel der Immunsuppressiva.....	55
3.8. Leukozyten.....	57
3.9. Lymphozyten.....	58
3.10. Hämoglobin.....	59
3.11. TNF- $\alpha$ , MCP-1 und Interleukin-8 .....	61
3.12. CK und CK-MB .....	63
3.13. Komplement (C3, C4) .....	64
3.14. Zunahme des Herzgewichts .....	66
3.15. Pathologie, Histopathologie und Immunhistochemie .....	67
4. DISKUSSION .....	74
4.1. Vor- und Nachteile der Xenotransplantation im Vergleich zur Allotransplantation und anderen Therapieformen der terminalen Herzinsuffizienz.....	74
4.2. Orthotope Xeno-Herztransplantation als präklinisches Modell .....	80
4.3. Immunologie .....	81

4.3.1. Bedeutung von GAS 914 und des Human Decay Accelerating Factors (hDAF) bei der Unterdrückung der hyperakuten Abstoßung .....	81
4.3.2. Bedeutung von Cyclophosphamid und Rituximab bei der Unterdrückung der akut-vaskulären Abstoßung .....	84
4.3.3. Die Kombination Tacrolimus-Sirolimus-ATG zur Unterdrückung zellulärer Abstoßungsmechanismen .....	86
4.3.4. Weitere Transgene und Immunsuppressiva .....	87
4.3.5. Akkommodation und Toleranz.....	89
4.3.6. Splenektomie.....	92
4.3.7. Bestrahlung.....	92
4.4. Gerinnungsproblematik in der Xenotransplantation .....	93
4.4.1. Gerinnungsaktivierung durch Abstoßung und molekulare Inkompatibilitäten.....	93
4.4.2. Gerinnungshemmung .....	95
4.5. Infektiologie in der Xenotransplantation.....	97
4.6. Ethische Aspekte der Xenotransplantation .....	99
4.7. Wirtschaftliche Aspekte der Xenotransplantation.....	99
5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....	101
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	104
7. LITERATURVERZEICHNIS .....	106
8. LEBENSLAUF .....	125
9. DANKSAGUNG.....	126

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Problem des Organspendermangels in der Transplantationsmedizin

### Anzahl der herztransplantierten und für HTx gelisteten Patienten in Deutschland 1998-2005

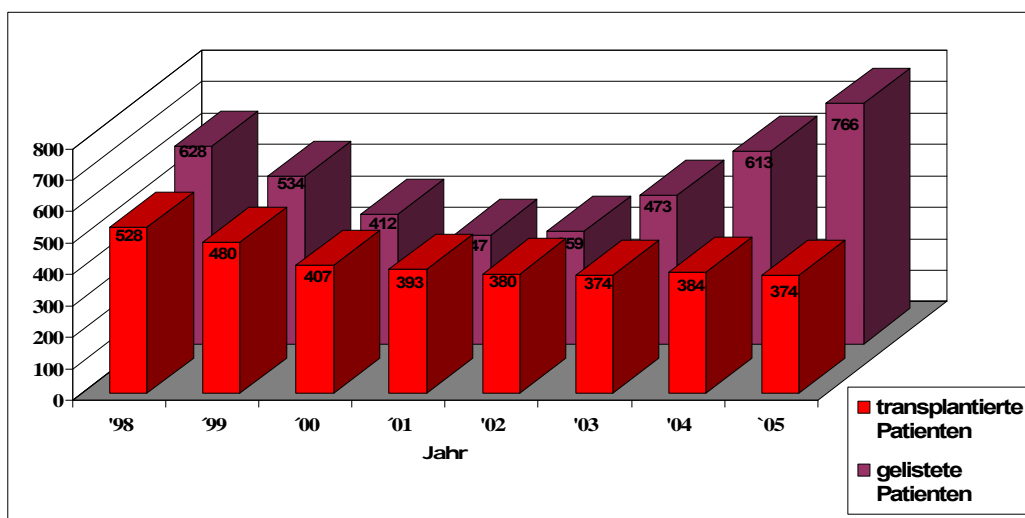


Abb. 1.1.: Anzahl der für Herztransplantation gelisteten Patienten und tatsächlich durchgeführte Herztransplantationen in Deutschland 1998-2005

Leider gibt es in Deutschland viel zu wenig Spenderorgane, so dass täglich drei Menschen auf der Warteliste sterben. Bestrebungen, die Anzahl der Transplantationen zu erhöhen, waren bisher nur wenig erfolgreich. Die DSO (Deutsche Stiftung Organtransplantation) versucht mit Aufklärungskampagnen in Schulen und dem Verteilen von Organspendeausweisen, die Aufmerksamkeit der Öffentlichkeit für das Thema Organspende zu gewinnen. Wirklich helfen würde nur die z.B. in Österreich, Belgien und Luxemburg geltende sog. ``Widerspruchslösung'', wonach jeder Bürger grundsätzlich potentieller Organspender ist, es sei denn, er widerspricht schriftlich zu Lebzeiten: oben genannte Länder führen 70-87

Transplantationen pro eine Million Einwohner durch, Deutschland nur 41 (Cooper 2002). Mit unserer Verfassung ist eine derartige Lösung leider nicht kompatibel. Das deutsche Transplantationsgesetz, das 1997 implementiert wurde, konnte nicht verhindern, dass die Schere zwischen Patienten auf der Warteliste und durchgeführten Transplantationen weiter auseinander ging (s.a. Abb.1.1.). Verantwortlich hierfür sind natürlich auch die guten Ergebnisse der Herztransplantation, die dazu führten, dass immer mehr Patienten dieser Therapieform zugeführt wurden. Verlängerte Wartezeiten erhöhen die Mortalität auf der Warteliste. Versuche, um jeden Preis die Anzahl der Organspender zu erhöhen, werden die Ergebnisse langfristig eher verschlechtern. Ältere Organspender mit internistischer (hypertensiv bedingte intracerebrale Massenblutung) oder neurologischer (Subarachnoidalblutung) Todesursache benötigen eine ausführlichere Vordiagnostik, was die Kosten erhöht und sind in der Regel jüngeren Organspendern mit traumatischer Todesursache (Schädel-Hirn-Trauma) im Langzeitergebnis unterlegen. Marginale Spenderorgane mit beispielsweise linksventrikulärer Hypertrophie und Koronarstenosen zu akzeptieren und bei der Transplantation gleich eine Bypassoperation mit durchzuführen, gelingt nur in Einzelfällen.

Bei Nieren- und Lebertransplantation hat sich mittlerweile die Lebendspende soweit etabliert, dass ein Teil des Organmangels abgefangen werden konnte, wobei zu beachten ist, dass gerade im Falle der Leber das perioperative Risiko des Spenders nicht unterschätzt werden darf.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es selbst unter Ausschöpfung aller Möglichkeiten (Akzeptanz marginaler Spenderorgane, Lebendspende, Widerspruchslösung) in Zukunft einen Organmangel geben wird, der es erforderlich macht, auch alternative Organsquellen wie das Tier in Betracht zu ziehen.

## 1.2. Begriffsklärung und Geschichte der klinischen Xeno-Herztransplantation

„Xeno“ ist das griechische Wort für „fremd“. Während *Allotransplantation* die Transplantation zwischen Individuen der gleichen Spezies bezeichnet (z.B. Mensch auf Mensch), versteht man unter *Xenotransplantation* eine Transplantation zwischen Individuen verschiedener Spezies.

Calne unterteilte weiter in *diskordante* und *konkordante* Xenotransplantation (Calne 1970):

Von *konkordant* spricht man, wenn ein Xenotransplantat mit demselben Tempo und derselben Intensität abgestoßen wird wie ein Allotransplantat. Eine hyperakute Abstoßung findet nicht statt. Ein Beispiel wäre die Transplantation eines Organs vom Pavian auf den Menschen.

Bei der *diskordanten* Xenotransplantation wird das Organ schnell und stark (hyperakut) durch präformierte Antikörper abgestoßen. Sie ähnelt der Abstoßung bei ABO-Inkompatibilität in der Allotransplantation und tritt immer dann auf, wenn man Organe phylogenetisch vom Menschen weit entfernter Spezies transplantiert. Beispiele für *diskordante* Kombinationen sind Schwein auf Mensch und Schwein auf Pavian.

Am 23. Januar 1964, fast vier Jahre vor der ersten humanen Allotransplantation durch Barnard, transplantierte James Hardy (Mississippi, USA) ein Schimpansenherz in einen 68-jährigen Patienten im kardiogenen Schock. Der Patient starb nach 90 Minuten, da das Herz zu klein war, um ein ausreichendes Herzzeitvolumen zu erzeugen (Hardy 1964).

1968 gab es zwei Versuche von Ross (Schwein) und Cooley (Schaf). Beide Herzen wurden hyperakut abgestoßen. Marion transplantierte 1969 ein Schimpansenherz nach einer misslungenen Mitralklappenoperation. Die Patientin starb an Rechtsherzversagen wegen pulmonaler Hypertension. 1977 führte Barnard zwei heterotope Xenoherztransplantationen

nach misslungenen Herzoperationen durch (Barnard 1977): das Pavianherz war zu klein, um den Kreislauf aufrechtzuerhalten, das Schimpansenherz wurde nach vier Tagen abgestoßen.

Die bisher erfolgreichste Xenoherztransplantation in der Geschichte wurde 1984 von Leonard Bailey (Bailey 1985) in Loma Linda (Kalifornien, USA) durchgeführt: Das 12 Tage alte Baby Fae mit hypoplastischem Linksherzsyndrom erhielt das Herz eines Pavians. Die Immunsuppression wurde mit Cyclosporin durchgeführt. Nach 20 Tagen starb Baby Fae an einer humoralen Abstoßung.

1992 transplantierte Religa in Polen (Czaplicky 1992) ein Schweineherz orthotop in einen Mann mit Marfan-Syndrom. Die präformierten Antikörper waren zuvor von einem zweiten Schweineherzen mithilfe der extrakorporalen Zirkulation absorbiert worden. Nach 23 Stunden starb der Patient. Die Autoren gaben als Todesursache die kleine Größe des Herzens an, wobei eine Abstoßung nicht ausgeschlossen werden kann.

Der letzte Versuch einer xenogenen Herztransplantation am Menschen wurde 1996 in Indien von Baruah unternommen, der ein Schweineherz in einen 32-Jährigen Mann mit Ventrikelseptumdefekt transplantierte. Der Mann starb am 7. postoperativen Tag im septischen Schock. Baruah wurde wegen Missachtung des Human Organ Transplantation Act von 1994 verhaftet (Deschamps 2005).

Die bisherigen Ergebnisse klinischer Xeno-Herztransplantationen waren so schlecht, dass man Abstand von weiteren Versuchen nahm. Man kam überein, dass die Abstoßungsmechanismen zunächst im Tiermodell weiter studiert werden sollen.

Im Jahre 2000 setzte die ISHLT (International Society of Heart and Lung Transplantation) die Bedingungen für den Start einer klinischen Studie fest: die 3-Monats-Überlebensrate in einer konsekutiven Versuchsreihe orthotoper Herztransplantationen mit Primaten muss mindestens 60% betragen, wobei mindestens 10 Tiere 3 Monate überleben müssen (Cooper 2000).



# Geschichte der klinischen Xeno-Herztransplantation:

- 1964 Hardy (Schimpanse: 2 Stunden überlebt)
- 1968 Cooley (Schaf: 10 Minuten)
- 1968 Ross (Schwein: 4 Minuten)
- 1969 Marion (Schimpanse: 4 Stunden)
- 1977 Barnard (Pavian: 5 Stunden)
- 1977 Barnard (Schimpanse: 4 Tage)
- 1984 Bailey (Pavian: **20 Tage**)
- 1992 Religa (Schwein: 23 Stunden)
- 1996 Baruah (Schwein: 7 Tage)

Abb. 1.2.: Bisher am Menschen durchgeführte Herztransplantationen mit tierischen Organen und ihre Überlebenszeiten

## 1.3. Das Schwein als Organspender

Primaten hätten den Vorteil, dass sie phylogenetisch näher mit dem Menschen verwandt sind und daher die Abstoßungsreaktion geringer ausgeprägt ist (Barnes 1972).

Aufgrund dieser nahen Verwandtschaft bestehen aber ethische Bedenken, sie als Organspender zu benutzen (Nairne 1996, Kennedy 1997). Des Weiteren lassen sie sich schlecht züchten, haben lange Tragzeiten, nur wenige Nachkommen, wachsen langsam und erreichen oft nicht die für den Menschen erforderliche Größe. Zudem besteht die Möglichkeit, dass sie Retroviren auf den Menschen übertragen. Aus diesem Grunde erklärte die Food and Drug Administration im Jahre 1999 ein Moratorium der Xenotransplantation von Primatenorganen auf Menschen (US guidelines on xenotransplantation 1999).

Das Schwein hat sich aus mehreren Gründen als der am besten geeignete Organspender herauskristallisiert: frühe Geschlechtsreife, kurze Tragzeit, viele Nachkommen und ausreichende Größe. Überdies können Schweine genetisch modifiziert werden, um ihre Diskordanz mit Menschen zu reduzieren (Lai 2002, Ramsoondar 2003). Trotz zahlreicher physiologischer Unterschiede zwischen Schwein und Mensch, z.B. Proteinsynthese in der Leber, Körpertemperatur, Hormonsystem, Gerinnungssystem etc., ist eine ausreichende Funktion des Schweineherzens ("life-supporting") auch in einem aufrecht gehenden Lebewesen erwiesen (Hammer 1997, Vial 2000). Die ethischen Bedenken sind im Vergleich zum Primaten zu vernachlässigen, da jährlich Millionen von Schweinen zum Verzehr oder auch zur Herstellung von Medizinprodukten (Insulin, Herzklappen) geschlachtet werden. Hinzu kommt, dass die Gefahr der Übertragung von Krankheiten geringer ist als bei Primaten. Es gibt bisher auch keinen einzigen klinischen Fall einer Übertragung von porcinen endogenen Retroviren (PERV, s.a. Kap. 4.5.) von Schwein auf Mensch (Paradis 1999). Der einzige Nachteil, den Schweine haben, ist die entfernte phylogenetische Verwandtschaft, die sich in molekularen Inkompatibilitäten der Gerinnungsfaktoren (siehe Kap. 4.4.1.) und der ausgeprägten Immunreaktion nach Transplantation (siehe Kap. 1.4.1.) widerspiegelt.

## 1.4. Formen der Abstoßungsreaktion nach Xenotransplantation und deren Therapieansätze

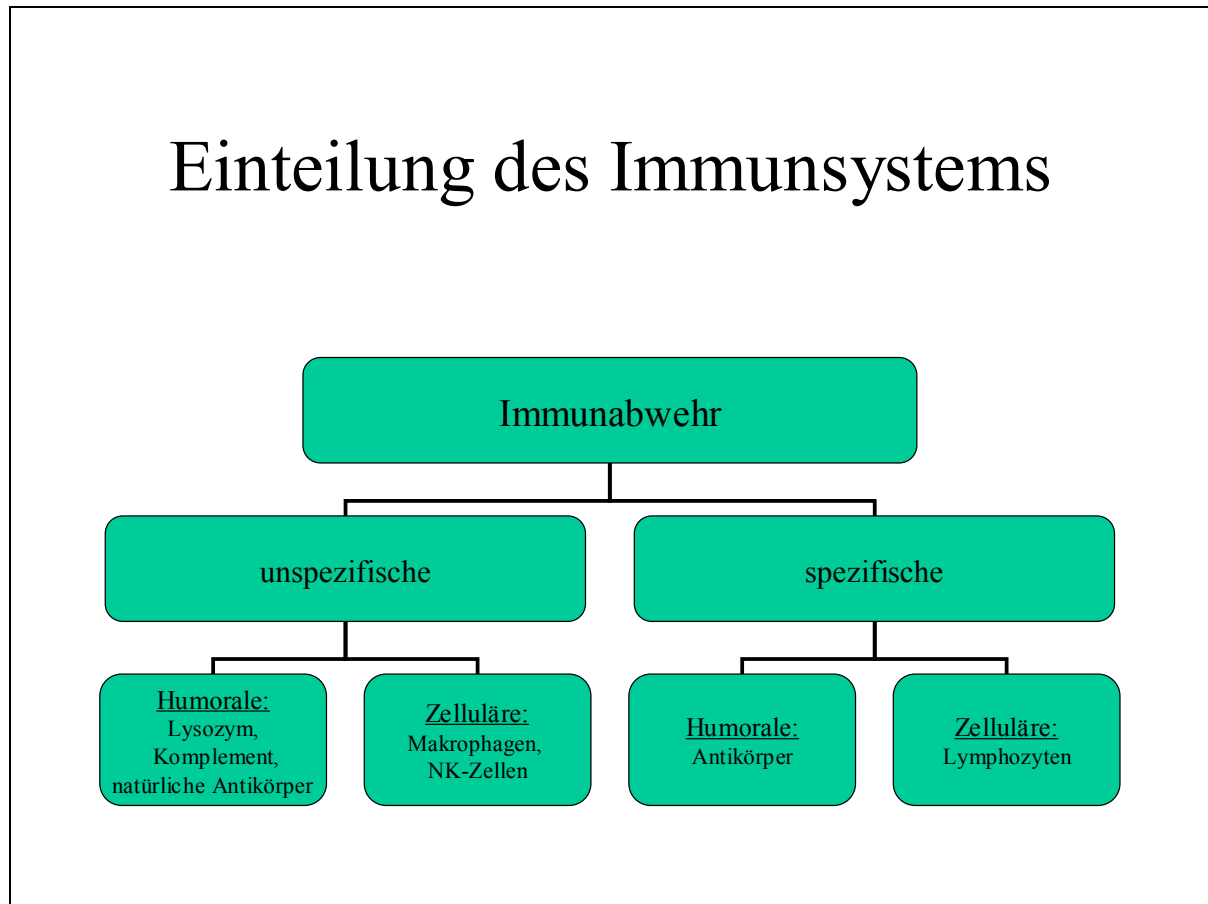


Abb. 1.3.: Überblick über das menschliche Immunsystem: es wird eingeteilt in unspezifisch-angeborene und spezifisch-erworbene Abwehrmechanismen

### 1.4.1. Hyperakute Abstoßung

Die mikrobiologische Kolonisation des Gastrointestinaltraktes während der ersten Lebenswochen des Menschen führt zur Entwicklung natürlicher Antikörper gegen das Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Epitop, welches sich auf der Oberfläche verschiedener Bakterien, Viren und Parasiten befindet. Diese natürlichen anti-Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper können mit den Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Epitopen, die auf Schweineendothelzellen exprimiert werden, kreuzreagieren. Das Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Epitop wurde 1992 von Good und Kollegen identifiziert (Good 1992). Da

es strukturelle Ähnlichkeit mit dem Blutgruppenantigen 'B' hat, kann es als Schweineblutgruppenantigen betrachtet werden.

Nach der Implantation eines vaskularisierten Schweineorgans in einen Primaten binden natürliche, präformierte Antikörper an das Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Epitop der Schweineendothelzellen, wodurch das Komplementsystem aktiviert wird.

Es handelt sich hierbei um ein Kaskadensystem, in dessen Verlauf Spaltprodukte von Plasmaproteinen (C1-C9) entstehen, die mit kleinen Buchstaben näher bezeichnet werden, z.B. C3a (kleineres Fragment) und C3b (größeres Fragment). Es kann über den sog. klassischen (C1 bindet an den Fc-Teil eines antigengebundenen Antikörpers) oder alternativen Weg (C3b bindet an Fremdoberflächen) aktiviert werden (siehe Abb. 1.4.). Am Ende der Komplementkaskade wird durch den Membran-Angriffskomplex eine Pore in die Zielzelle eingebaut, was zur osmotischen Lyse führt. Es kommt zur Kontraktion der Endothelzellen und zur Freilegung der subendothelialen Matrix und des Gewebefaktors (= tissue factor), wodurch die Thrombozytenaggregation gefördert und das Gerinnungssystem aktiviert wird. Durch die erhöhte Gefäßpermeabilität bilden sich interstitielle Hämorrhagien und Ödeme. Oberflächenstrukturen wie Heparansulfat, Thrombomodulin und ATPDase (CD39) gehen verloren, wodurch die Endothelzellen von einem anti- in einen prokoagulatorischen Zustand gebracht werden (= Endothelzellaktivierung Typ 1). Die thrombotischen Gefäßverschlüsse (Rose 2000) haben einen Myokardinfarkt und den Verlust des Transplantats zur Folge.

Es existieren folgende **therapeutische Strategien** zur Vermeidung der hyperakuten Abstoßung:

Entfernung des  $\alpha$ -Gal-Epitops im Spenderschwein bzw. Entfernung der anti- $\alpha$ -Gal-Antikörper im Empfänger:

Durch Deletion des Gal-Transferase-Gens entstehen sog. Gal-knock-out-Schweine, die das Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Epitop nicht mehr exprimieren (Tseng 2005).

Alternativ können durch Insertion des H-Transferase-Gens Blutgruppe '0' bzw. H-Antigen-Schweine hergestellt werden; durch Konkurrenz der H-Transferase (=  $\alpha(1,2)$ -Fucosyltransferase) mit der Gal-Transferase wird die Expression der Gal $\alpha(1,3)$ Gal-Epitope reduziert (Sandrin 1995).

Dies gelingt auch mit Hilfe transgener Schweine, die humane  $\alpha$ -Galactosidase exprimieren, welche das Gal $\alpha(1,3)$ Gal-Epitop auf der Endothelzelloberfläche enzymatisch spaltet (LaVecchio 1995).

Die Entfernung der anti-Gal $\alpha(1,3)$ Gal-Antikörper kann mit Hilfe einer Plasmapherese durchgeführt werden. Dieses Verfahren hat jedoch den Nachteil, dass die Infektabwehr des Empfängers durch die unspezifische Entfernung aller Immunglobuline stark geschwächt wird und zudem noch Plasmaproteine entfernt werden, die nach der Therapie wieder substituiert werden müssen (z.B. Albumin). Besser geeignet zur Entfernung xenoreaktiver Antikörper sind Immunadsorptionssäulen, die mit Gal-Gykokonjugaten beschichtet sind (Taniguchi 1996); so werden gezielt nur anti-Gal $\alpha(1,3)$ Gal-Antikörper eliminiert. Alternativ kann man das Blut des Empfängers vor der Transplantation durch ein Schweineorgan fließen lassen (Alwayn 1999).

Die Neutralisation xenoreaktiver Antikörper gelingt mit Hilfe von infundierbaren Gal-Konjugaten, z.B. GAS914 (Brandl 2005, Teranishi 2003).

#### Komplementinhibition:

Zum einen besteht die Möglichkeit, durch Applikation von Cobra Venom Faktor (Kobayashi 1997), löslichem Komplement-Rezeptor Typ 1 (Pruitt 1994) oder C1-Esterase-Inhibitor (Berinert<sup>®</sup>) das Komplementsystem systemisch zu hemmen, was jedoch mit einem hohen infektiologischen Risiko verbunden ist.

Alternativ kann man durch die Herstellung transgener Schweine, die humane Komplementregulatoren (hDAF, hCD59, hCD46) in hoher Dichte auf ihrem Endothel

exprimieren, die Komplementkaskade an verschiedenen Stellen hemmen (McCurry 1995, Zhou 2005).

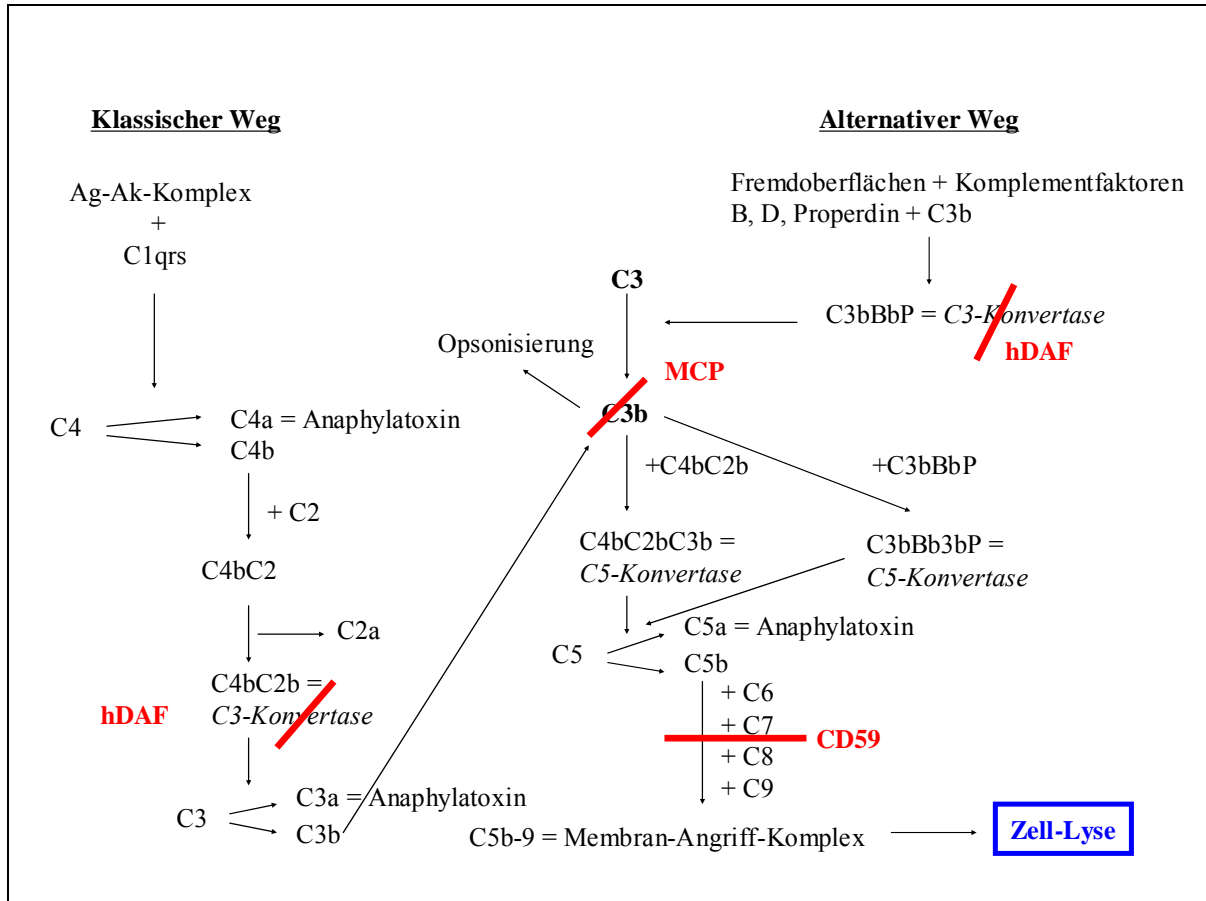


Abb. 1.4.: Das Komplementsystem und Angriffspunkte von Komplementregulatoren (rot)

Säugetiere tragen zum Schutz gegen den Angriff durch körpereigenes Komplement auf ihrer Zelloberfläche Komplementregulatoren. Initial wurde angenommen, dass diese Proteine speziesspezifisch sind (Atkinson 1991), so dass z.B. nur humanes DAF, nicht aber Schweine-DAF, in der Lage ist, humanes Komplement zu inhibieren. In jüngerer Zeit sieht man das Konzept der Speziesspezifität jedoch zunehmend kritisch, da man festgestellt hat, dass es mehr auf die Dichte der auf dem Endothel exprimierten Komplementregulatoren ankommt als darauf, dass diese Regulatoren humane Proteine sind (Morgan 2005). Auch Schweine-CD59 konnte beispielsweise in einem Mausmodell humanes Komplement hemmen (Fiscaro 2000).

*Zusammenfassung der Möglichkeiten, die Komplementkomponente der hyperakuten*

*Abstoßung zu inhibieren:*

hCD55 = hDAF (human decay accelerating factor):

Decay Accelerating Factor, ein auf allen Endothelzellen verankertes Membranprotein, bindet kompetitiv mit C2 an C4, wodurch die Bildung der C3-Konvertase des klassischen Weges gehemmt wird. Des Weiteren verhindert DAF im alternativen Weg die Bindung von Faktor B an C3b, wodurch auch hier die Bildung von C3-Konvertase gehemmt wird.

hCD46 = hMCP (human membrane cofactor protein):

Membrane Cofactor Protein ist ein Membranprotein, das als Cofaktor bei der Inaktivierung von C3b eine wichtige Rolle spielt.

hCD59 = hMIRL (human membrane inhibitor of reactive lysis):

CD59 ist ein membrangebundenes Protein, das die Entstehung des Membran-Angriffs-Komplexes verhindert.

sCR1:

Komplement-Rezeptor Typ 1 beschleunigt die Dissoziation der C3- und C5-Konvertase durch Bindung von C3.

CVF:

Cobra-Venom-Faktor aktiviert die C3-Konvertase und depletiert/verbraucht dadurch C3.

C1-Esterase-Inhibitor (Berinert<sup>®</sup>):

C1-Esterase-Inhibitor hemmt die Aktivierung von C1 (klassischer Weg).

#### **1.4.2. Akut-vaskuläre (humorale) Abstoßung / akut-zelluläre Abstoßung**

Mit den oben genannten Maßnahmen gelingt es mittlerweile fast immer, die hyperakute Abstoßung zu vermeiden. Die größte Hürde zur erfolgreichen Xenotransplantation stellt derzeit die **akut-vaskuläre** (humorale) Abstoßungsreaktion dar. Sie tritt innerhalb von Tagen auf und wird zum einen durch *präformierte bzw. induzierte* anti-Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper

verursacht (Teranishi 2002), aber v.a. durch *induzierte* anti-Schwein-Antikörper, die an *non-Gal $\alpha$ (1,3)Gal*-Antigene des Schweineendothels binden (Chen 2005). Dies führt zur Aktivierung der Endothelzellen (Lin 1998, Nagayasu 2000). Es kommt zur Proteinsynthese (= Endothelzellaktivierung Typ 2) von Adhäsionsmolekülen (E-Selectin u.a.), proinflammatorischen Zytokinen (Il-8, MCP-1) und prokoagulatorischen Molekülen (tissue factor, plasminogen activator inhibitor). Gleichzeitig wird durch Endothelzellretraktion die subendotheliale Matrix mit Kollagen und von-Willebrand-Faktor freigegeben, was zur Thrombozytenaggregation führt. Natürliche Killerzellen binden mit ihrem Fc-Rezeptor an die Immunglobuline und lysieren die Endothelzellen (=ADCC = antibody dependent cellular cytotoxicity).

Histologisch unterscheidet sich das Bild der akut vaskulären wenig von dem der hyperakuten Abstoßung: interstitielles Ödem und Hämorrhagien, Endothelzellrupturen, Thrombosen, v.a. in den Venolen, Immunglobulin- und Komplementablagerung entlang dem Endothel sowie mehr oder weniger ausgeprägtes Infiltrat mononukleärer Zellen (Pino-Chavez 2001).

Die Synthese dieser induzierten anti-non-Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper ist größtenteils nur mit Hilfe eines T-Zell-abhängigen Mechanismus möglich (Bühler 2000). Die Interaktion von CD40 auf B-Zellen (Antigen-präsentierende Zellen) mit CD40-Ligand (= CD154) auf T-Zellen wird als **Co-Stimulation** bezeichnet. Sie stellt ein stark aktivierendes Signal für B-Zellen dar, zu Plasmazellen zu differenzieren und Antikörper zu produzieren. Durch eine Co-Stimulationsblockade mit anti-CD40Ligand (= anti-CD154-Antikörper) ist es im heterotopen Schwein-Pavian-Modell bereits gelungen, das Auftreten von induzierten anti-Schwein-Antikörpern zu verhindern (Kuwaki 2004). Zusätzlich kann der B7/CD28-Signalweg mittels CTLA4-Ig (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4) unterbrochen werden (Alwayn 1999, Wu 2005).



Es existieren folgende **therapeutische Strategien** zur Vermeidung der akut vaskulären Abstoßung:

Neutralisation bzw. Entfernung der induzierten Antikörper:

Die anhaltende Neutralisation der Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper gelingt mit der täglichen Applikation von GAS914 (s.o.). Mit der regelmäßigen Immunadsorption können Antikörper aus dem Blut des Empfängers entfernt werden (Brenner 2000).

Elimination der B-Zellen:

Verfahren zur Elimination der B-Zellen sind die Splenektomie (Zaidi 1997) und die Bestrahlung (Kozlowski 1998). Medikamentös stehen u.a. der anti-CD20-Antikörper Rituximab oder das Zytostatikum Cyclophosphamid zur Verfügung.

Inhibition der T-Zell-abhängigen B-Zell-Aktivierung und Antikörperproduktion:

Anti-CD40-Ligand (Bühler 2000, Kuwaki 2004) oder CTLA4-Ig bewirken eine Co-Stimulationsblockade, wodurch die T-Zell-abhängige B-Zell-Aktivierung unterbunden wird.

Verhinderung der Endothelzellaktivierung :

Die Endothelzellaktivierung als Ausgangspunkt der AVR kann verhindert werden durch verstärkte Expression protektiver Gene wie A1, A20 und HO-1, die mit einer verminderten Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B einhergehen und somit die Proteinsynthese proinflammatorischer und prokoagulatorischer Faktoren hemmen (Bach 1996/1997).

Akkommodation bzw. Toleranzinduktion: siehe Kap. 4.3.5.

Die **akut-zelluläre** Abstoßungsreaktion wird derzeit nach Xenotransplantation selten beobachtet. Man vermutet, dass die T-Zellaktivierung durch Co-Stimulation der B-Lymphozyten sehr schnell zur Antikörperproduktion und damit zu einer humoralen Abstoßung führt und es so nicht zu einem signifikanten T-Zell-Infiltrat im Transplantat kommen kann (Zhu 2007). Es ist davon auszugehen, dass die akut-zelluläre Abstoßungsreaktion im Xenotransplantationsmodell mindestens so stark sein wird wie bei der

Allotransplantation. Sie wird jedoch durch Optimierung des immunsuppressiven Basisregimes (Tacrolimus / Sirolimus / Steroide) gut beherrscht.

### **1.4.3. Chronische Abstoßung**

Die Transplantatvaskulopathie ist derzeit der limitierende Faktor für das Langzeitüberleben nach allogener Herztransplantation (Andersen 1999, Weis 2000). Es handelt sich dabei um einen die Koronararterien stenosierenden Prozess durch Intimaproliferation und Wucherung der glatten Gefäßmuskelzellen sowie interstitielle Fibrosierung. Fünf Jahre nach Transplantation weisen ca. 50% der Patienten angiographische Veränderungen auf, höhergradige Stenosen ca. 10% (Costanzo 1998). Prädisponierend wirken mehrere akute Abstoßungsreaktionen im Laufe der Zeit, wobei man annimmt, dass jede Entzündungsreaktion proliferationsfördernde Wachstumsfaktoren freisetzt. Additiv wirken CMV-Infektionen. Auch das Spenderalter und die Ischämiezeit könnten pathogenetisch eine Rolle spielen.

Darüber hinaus setzt die Transplantatvaskulopathie umso früher ein, je mehr Risikofaktoren für Atherosklerose der Patient aufweist (Hypertonus, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, Hyperhomocysteinämie usw.). Die Therapie mit Statinen bringt eine Prognoseverbesserung mit sich (Wenke 1997).

Viel versprechend ist in diesem Zusammenhang auch das Immunsuppressivum Sirolimus.

Sein antiproliferativer Effekt auf glatte Muskelzellen trägt dazu bei, die chronische Transplantatvaskulopathie und Nephropathie (Groetzner 2004) zu verringern.

Da die meisten Primaten im Xenotransplantationsmodell derzeit weniger als 100 Tage überleben, ist die chronische Abstoßung noch wenig erforscht. Man geht jedoch davon aus, dass sie im Langzeitverlauf mindestens genauso stark ausgeprägt sein wird wie im Allotransplantationsmodell. Im Falle eines unbegrenzten Spenderpools wäre dies jedoch kein Problem, da jederzeit ein neues Schweineherz transplantiert werden könnte.

	<b>Auftreten nach</b>	<b>Ursache</b>	<b>Therapieansätze</b>
<b>Hyperakute Abstoßung</b>	Minuten bis 24 Stunden	präformierte Antikörper (Gal), komplementvermittelt	Knock-out des $\alpha$ -Gal-Gens, Immunadsorption, GAS914, TPC; Komplementregulatoren (hDAF, hCD46, hCD59), Cobra Venom Faktor, sCR1, C1-Esterase-Inhibitor (Berinert <sup>®</sup> )
<b>Akut- vaskuläre (humorale) Abstoßung</b>	mehr als 24 Stunden	Induzierte (Gal- und non-Gal-) Antikörper (B- und T-Zell- vermittelt)	GAS914, Immunadsorption, Cyclophosphamid, Anti- CD20-AK (Rituximab), Anti-HLA-DR-AK, Anti- CD40L, CTLA4-Ig, protektive Gene (A1, A20), Splenektomie, Bestrahlung, Akkommodation, Toleranzinduktion
<b>Akut- zelluläre Abstoßung</b>	mehr als 24 Stunden	T-Zell-vermittelt, NK-Zellen	CyA, MMF, Tacrolimus, Sirolimus, Steroide, ATG, Cyclophosphamid, TRAIL, HLA-E, Toleranzinduktion
<b>Chronische Abstoßung</b>	Monaten	<i>Immunologisch:</i> T-Zell- vermittelt; <i>Nicht-immunologisch</i> durch Ischämie-Reperfusionsschaden, CMV-Infektionen, hohes Spenderalter, Arterioskleroserisikofaktoren	Sirolimus, Everolimus, Toleranzinduktion; CMV-Prophylaxe und – therapie (Ganciclovir), perfekte Einstellung von Blutdruck (ACE-Hemmer), Blutzucker und LDL- Cholesterin (Statine)

Tab. 1.1.: Formen der Abstoßungsreaktion nach Xenotransplantation, Ursachen und mögliche Therapieansätze

## 1.5. Fragestellung

Das Ziel dieser Studie war es, basierend auf den Vorarbeiten von Schmoeckel et al. 1998 und Brenner et al. 2003, sowie unseren eigenen ex vivo Perfusionsversuchen (Brandl 2005), im präklinischen orthotopen Xenotransplantationsmodell ein verlängertes Überleben hDAF-transgener Schweineherzen in Pavianen zu ermöglichen. Dabei sollte das Immunsuppressionsschema alle Abstoßungsmechanismen abdecken, aber moderater als das bis dahin dem internationalen Standard entsprechende Schema sein, um toxische Nebenwirkungen zu vermeiden. Spezielles Augenmerk wurde hierbei auf die Rolle des Zytostatikums Cyclophosphamid gelegt, dessen Dosis zur Induktionstherapie halbiert wurde. Das aufwendige, teure und invasive Verfahren der Immunadsorption zur Entfernung präformierter xenoreaktiver anti-Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper wurde durch die einfache Applikation von GAS 914 ersetzt.

Darüber hinaus wurde das Set-up der orthotopen Herztransplantation im Verlauf der Versuche durch autologe Bluttransfusion (cell saver, präoperative Eigenblutspende) und Verkleinerung des Schlauchsystems der Herz-Lungen-Maschine optimiert.

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1. Spendertiere**

Als Organspender wurden homozygote hDAF-transgene Schweine beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht von 6 – 15 kg verwendet. Es handelte sich hierbei um eine Kreuzung aus Large White und Landrasse-Schweinen (Imutran Ltd / Novartis Pharma AG, Harlan, Correzzana, Italien). Die Transgenität war durch DNA-Mikroinjektionstechnik eines Minigen-Konstrukts des hDAF-Gens (Cozzi 1995) hergestellt worden. Die Expression auf dem Gefäßendothel wurde vor jedem Versuch mittels Ohrbiopsie immunhistochemisch gesichert und quantifiziert. Hierfür wurde eine Färbung mit einem monoklonalen anti-hDAF-Antikörper (BRIC 216, IB-GRL Research Products, Estree, UK) durchgeführt.

### **2.2. Empfängertiere**

Organempfänger waren 11-17 kg schwere Paviane (*Papio anubis* bzw. *hamadryas*), die aus dem Deutschen Primatenzentrum Göttingen bzw. aus der Zentralen Versuchstierhaltung der Ludwig-Maximilians-Universität bezogen wurden. Die Tiere wurden gemäß den gesetzlichen Bestimmungen in Einzelkäfigen mit freiem Zugang zu Trinkwasser und Trockenfutter gehalten. Drei Wochen vor dem Versuch wurde den Pavianen ca. 100 ml Blut zur Herstellung eines Erythrozytenkonzentrats abgenommen. Danach wurden sie mit Erythropoietin behandelt. Auf diese Weise war ein suffizienter präoperativer Hämoglobinwert sichergestellt.

### **2.3. Technik der orthotopen Herztransplantation**

#### **2.3.1. Spenderoperation**

##### **2.3.1.1. Anästhesie**

Die Spendertiere wurden mit 20 mg/kg Körpergewicht Azaperon i.m. (Stresnil<sup>®</sup>, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland), 20 mg/kg Ketaminhydrochlorid i.m. (Ketavet<sup>®</sup>,

Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen, Deutschland) und 5 mg Midazolamhydrochlorid i.v. (Midazolam-ratiopharm<sup>®</sup>, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) über einen Zugang in der Ohrvene (24 GA, Becton Dickinson, S.A., Madrid, Spanien) sediert. Zur Reduzierung der Speichelsekretion wurden 0,5 mg Atropinsulfat i.m. (Atropinsulfat Braun<sup>®</sup>, B. Braun Melsungen GmbH, Melsungen, Deutschland) verabreicht. Nach Relaxierung mit 4 mg Pancuronium (Pancuronium Inresa, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland) wurde endotracheal intubiert. Die Narkose wurde mit 0,5 mg Fentanyl-dihydrogenicitrat (Fentanyl-Janssen<sup>®</sup>, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) und 3 ml/h Propofol 2% (Disoprivan<sup>®</sup>, AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland) aufrechterhalten. Die Vitalfunktionen wurden mittels EKG (Sirecust 308D, Siemens AG, Erlangen, Deutschland) und invasiver Blutdruckmessung mit Hilfe eines Druckdoms (Gould Statham P23 ID, Gould Ltd, England) über einen in der A. femoralis liegenden 7 French großen Katheter (Vygon GmbH, Aachen, Deutschland) überwacht. Dies erlaubte auch eine arterielle Blutgasanalyse (Ciba Corning 238 pH, Ciba Corning Ltd, England) zur Einstellung der Beatmungsparameter (volumenkontrollierte maschinelle Beatmung mit einem Gerät vom Typ Siemens Servo 900). Die Volumensubstitution erfolgte über einen zentralvenösen Zugang in der V. femoralis mit einem 22 GA Katheter (Becton Dickinson, S.A., Madrid, Spanien).

#### 2.3.1.2. Explantation

Nach sterilem Abdecken wurde median sternotomiert, das Perikard längs geschlitzt und Heparin (400 I.E./kg; Heparin-Natrium Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in die Vena cava superior appliziert. Nach Einbringen einer 12 French großen Aortenwurzelkanüle (Medtronic, Minneapolis, USA) wurden beide Vv. cavae ligiert (Ethibond 2-0). Um das Herz zu entlasten, wurde die rechte obere Lungenvene und die Vena cava inferior inzidiert. Anschließend wurde die Aorta oberhalb der Kanüle quer geklemmt und der kardioplegische Herzstillstand durch Infundieren von 50 ml/kg Bretschneider-Lösung

(Custodiol<sup>®</sup>, Franz Koehler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein, Deutschland) und topischer Kühlung (Ringer-Lactat, 4°C) induziert. Herz und Lungen wurden nach Durchtrennung der Vv. cavae, Aorta und Trachea en-bloc explantiert, und die Lungen ex vivo mittels Ligatur der Aa. und Vv. pulmonales abgesetzt. Die Vena cava superior und ein evtl. vorhandenes persistierendes Foramen ovale wurden übernäht.

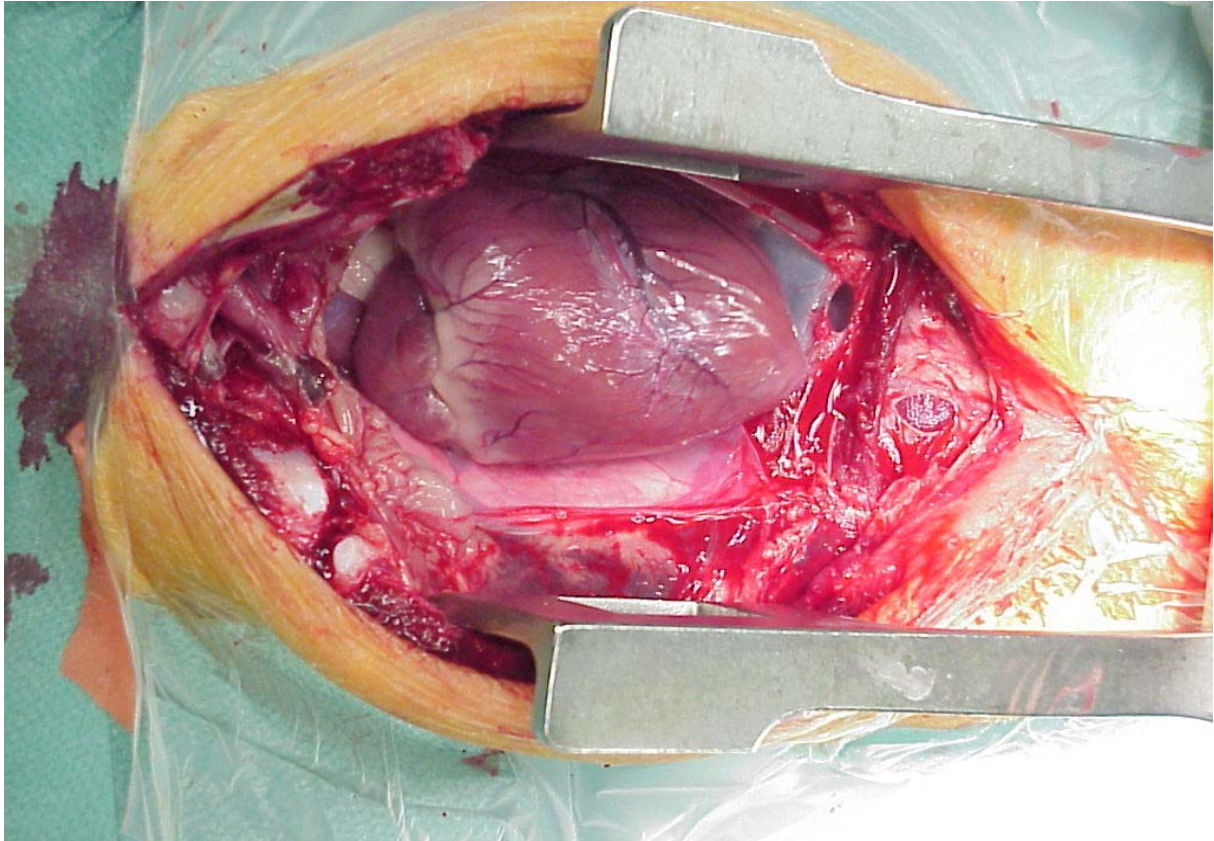


Abb. 2.1.: Schweinesitus vor Explantation



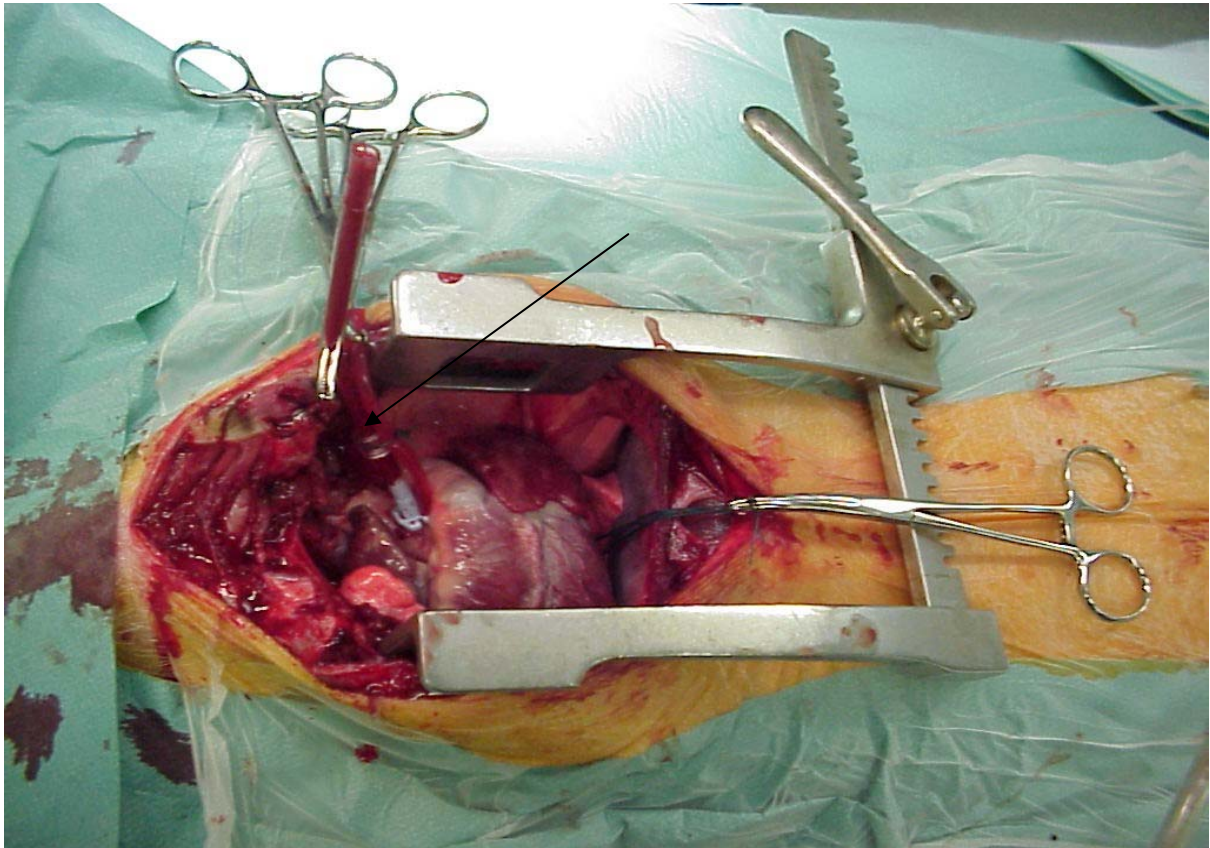


Abb. 2.2.: Eingebraachte Aortenwurzelkanüle (Pfeil) zur Perfusion der Koronarien mit Kardioplegielösung

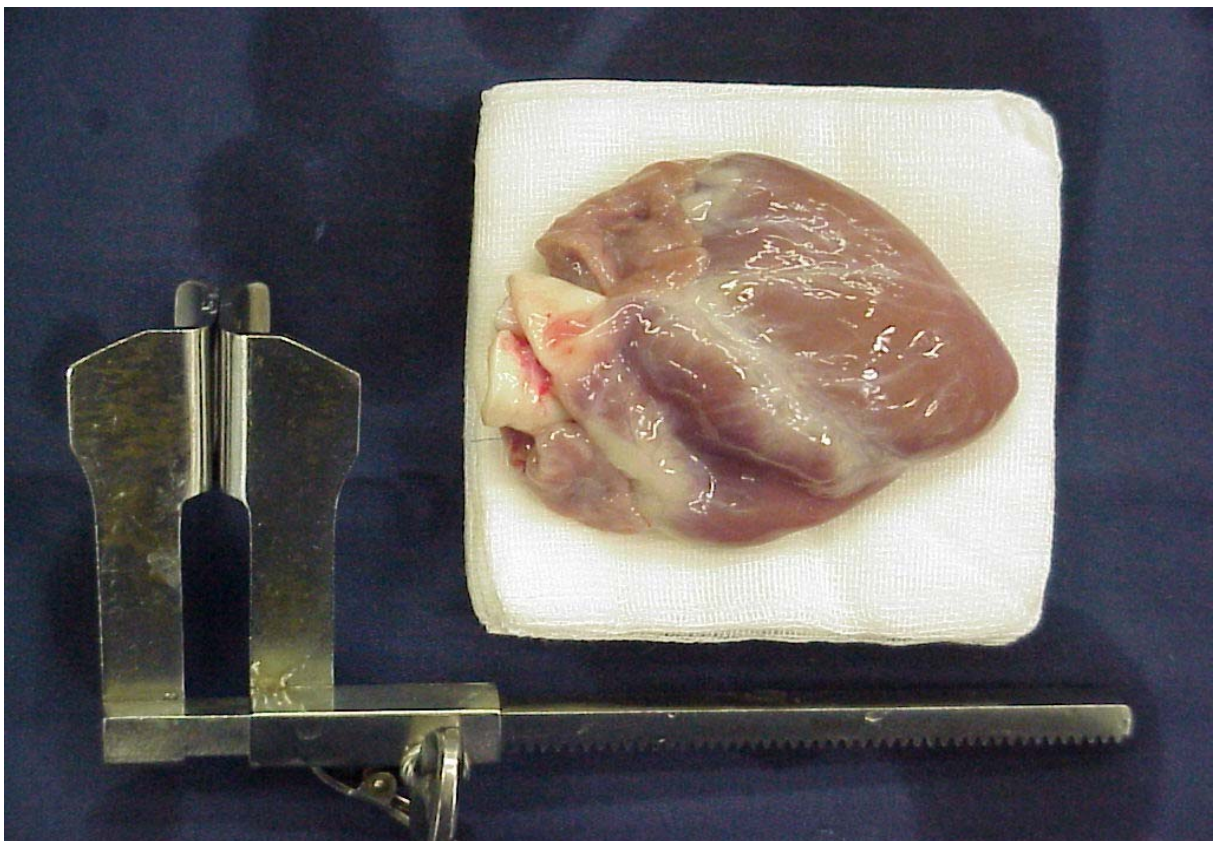


Abb. 2.3.: Explantiertes, kardioplegiertes Schweineherz





Abb. 2.4.: Übernähung der Vena cava superior

## 2.3.2. Empfängeroperation

### 2.3.2.1. Anästhesie

Die Paviane wurden mit 2 mg/kg Xylazinhydrochlorid (Rompun<sup>®</sup>, BayerVital GmbH & Co. KG, Leverkusen, Deutschland)) und 10 mg/kg Ketaminhydrochlorid i.m. sediert und intubiert. Bedarfsweise wurde zusätzlich Midazolam (1 -5 mg i.v.) verabreicht. Die Narkose wurde mit Propofol (80 mg/h) und Boli von Fentanyl Dihydrogencitrat aufrechterhalten. Das hämodynamische Monitoring erfolgte äquivalent dem Spendertier, beinhaltete aber zusätzlich die Messung des Herzzeitvolumens (PiCCO V 4.1; Pulsion Medical Systems, München, Deutschland). Die Körperkerntemperatur wurde mittels einer rektalen Sonde gemessen. Zur perioperativen Infektiosprophylaxe wurden 30 mg/kg Cefuroxim (Zinacef<sup>®</sup>, Glaxo-Smith Kline, München, Deutschland) vor Hautschnitt verabreicht.

### 2.3.2.2. Implantation

Nach sterilem Abdecken wurde median sternotomiert und das Perikard längs geschlitzt. Nach systemischer Vollheparinisierung (400 I.E./kg) wurden bei Erreichen einer ACT (activated clotting time) von 400 Sekunden Aorta und beide Vv. cavae kanüliert (Medtronic, Minneapolis, USA), zur extrakorporalen Zirkulation übergegangen und die Körpertemperatur auf 30°C abgesenkt. Nach Klemmen der ascendierenden Aorta wurde das native Pavianherz unter Belassung von Teilen beider Vorhöfe exzidiert, und das Schweineherz in der Manschettentechnik nach Lower und Shumway (Lower 1960) implantiert. Die Anastomosierung wurde am linken Vorhof mit 5-0 Prolene (Ethicon / Johnson & Johnson, Somerville, New Jersey, USA) in fortlaufender Nahttechnik begonnen. Es folgte die Anastomose des rechten Vorhofes (ebenfalls Prolene 5-0), der Pulmonalarterie (Prolene 6-0) und schließlich der Aorta (Prolene 6-0). Während der Fertigstellung der letzten Anastomose wurde die Wiedererwärmung begonnen. Nach ausführlicher Entlüftung des Herzens über Kanülen in der Aorta ascendens und in der Ventrikelspitze wurde die Aortenklemme gelöst und somit die Durchblutung des Herzens freigegeben. Falls Kammerflimmern auftrat, wurde intern mit 20 Joule defibrilliert, und das Herz in den Sinusrhythmus konvertiert. Die Ischämiezeiten (kalt und warm) lagen bei 90-120 Minuten. Es schloss sich eine mindestens 60 minütige Reperfusionphase an, während der der Kreislauf mithilfe der Katecholamine Noradrenalin (Arterenol<sup>®</sup>, Hoechst AG, Frankfurt/Main, Deutschland) und Adrenalin (Suprarenin<sup>®</sup>, Hoechst AG, Frankfurt/Main, Deutschland) von der HLM entwöhnt wurde. Sobald eine ausreichende Kontraktilität des Herzens vorlag, und der mittlere arterielle Druck konstant höher als 60 mmHg war, wurden die Kanülen der HLM entfernt, das gegebene Heparin mit Protaminsulfat (Protamin 1000 Roche<sup>®</sup>, Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) 1:1 antagonisiert und nach Einlage einer substernalen Drainage (Reproline Medical GmbH, Rheinbach, Deutschland) und Blutstillung der Thorax mit Drahtcerclagen (Ethicon / Johnson & Johnson, Somerville, New Jersey, USA) verschlossen. Es folgten

Fasziennaht (1-0 Vicryl, Ethicon / Johnson & Johnson, Somerville, New Jersey, USA) Subkutannaht (3-0 Vicryl) und Intrakutannaht (3-0 Monocryl, Ethicon / Johnson & Johnson, Somerville, New Jersey, USA). Wenn innerhalb einer Stunde keine signifikante Blutung auftrat, wurde die Perikarddrainage entfernt, andernfalls umgehend rethorakotomiert (dies kam jedoch im Verlauf der Versuchsreihe nur einmal vor). Nach 2-3 Stunden wurde der Pavian bei suffizientem Gasaustausch extubiert und nach Entfernung des arteriellen sowie des zentralvenösen Zuganges in nur noch leicht sediertem Zustand in seinen Käfig gebracht. Das EKG-Monitoring wurde belassen, Sauerstoff nasal appliziert.

#### Extrakorporale Zirkulation (Herz-Lungen-Maschine)

Die Bypass-Zeit bei einer orthotopen Xeno-Herztransplantation betrug durchschnittlich zwei Stunden: eine Stunde für das Anfertigen der Anastomosen (= Ischämiezeit) und eine Stunde für die Reperfusion.

Es wurde der Kinderoxygenator D 902 Lilliput 2 (Dideco/Sorin, Mirandola, Italien) verwendet. Die Schläuche der Herz-Lungen-Maschine waren mit kolloidaler Lösung (HES 6%) gefüllt, wobei das Primingvolumen im Verlauf der Versuchsreihe durch Kürzung des Schlauchsystems (HMT Medizintechnik GmbH, Maisach, Deutschland) sukzessive bis auf 250 ml verringert und damit der Hb-Abfall aufgefangen werden konnte. Die Verwendung eines cell-saver-Saugers (Fresenius HemoCare GmbH, Gräfelfing, Deutschland) trug ebenfalls zur Verbesserung des Hämoglobinwertes bei.

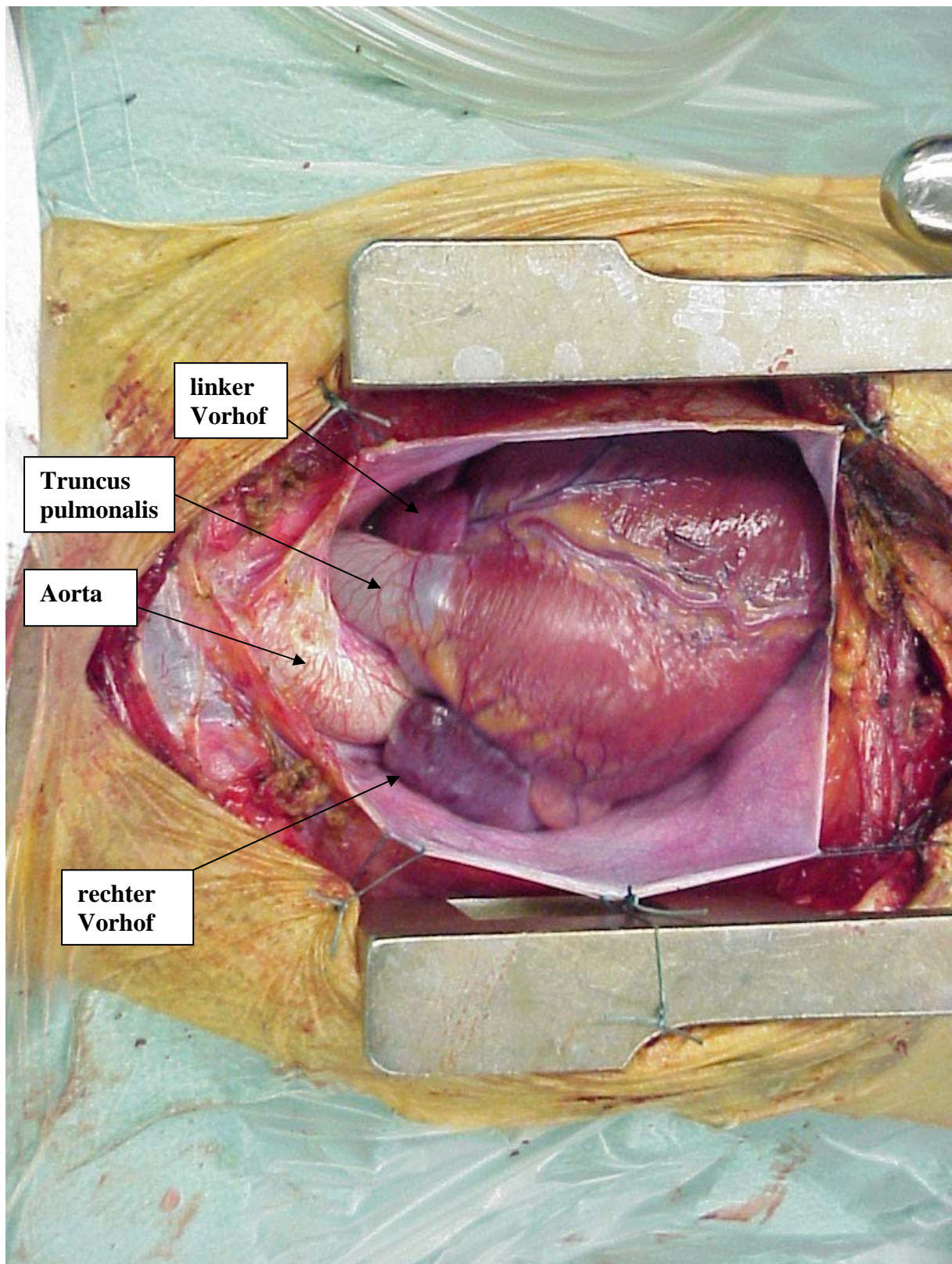


Abb. 2.5.: Paviansitus vor HTx



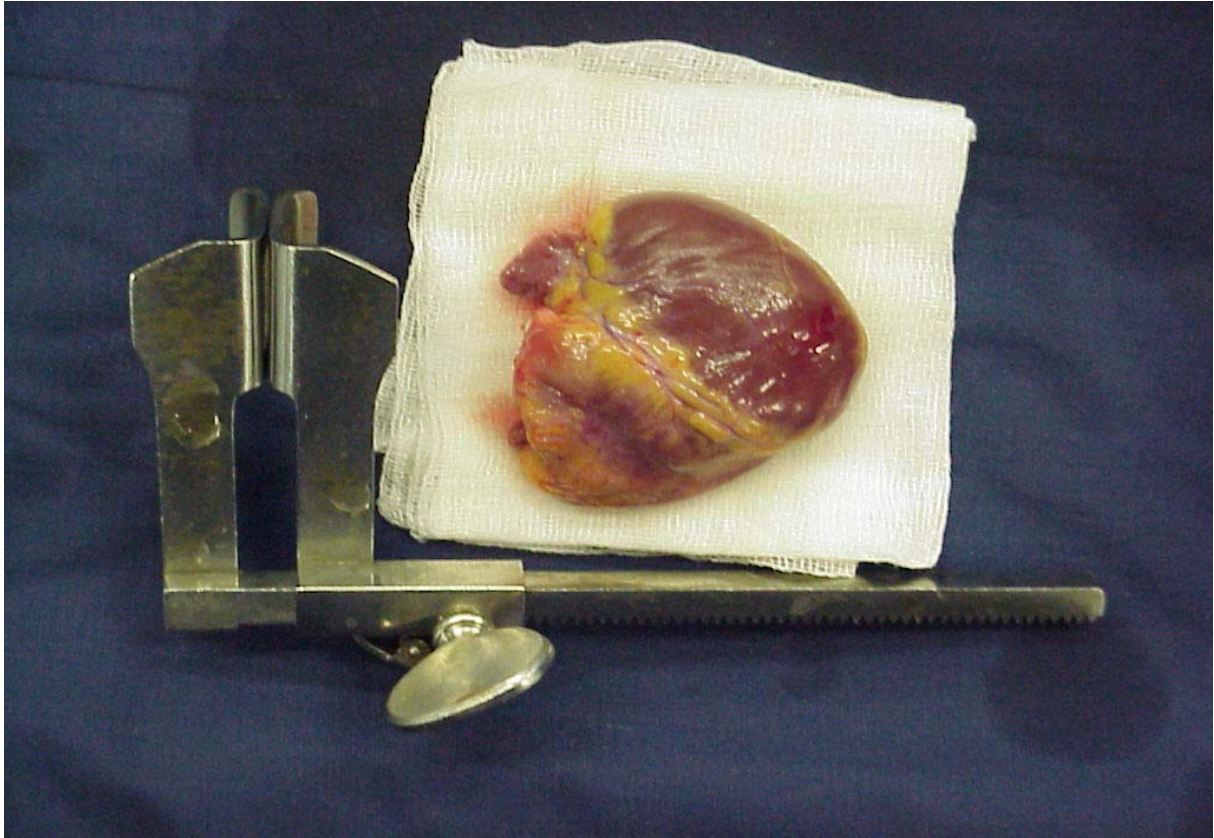


Abb. 2.6.: Exzidiertes Pavianherz; Teile der Vorhöfe verbleiben im Empfänger

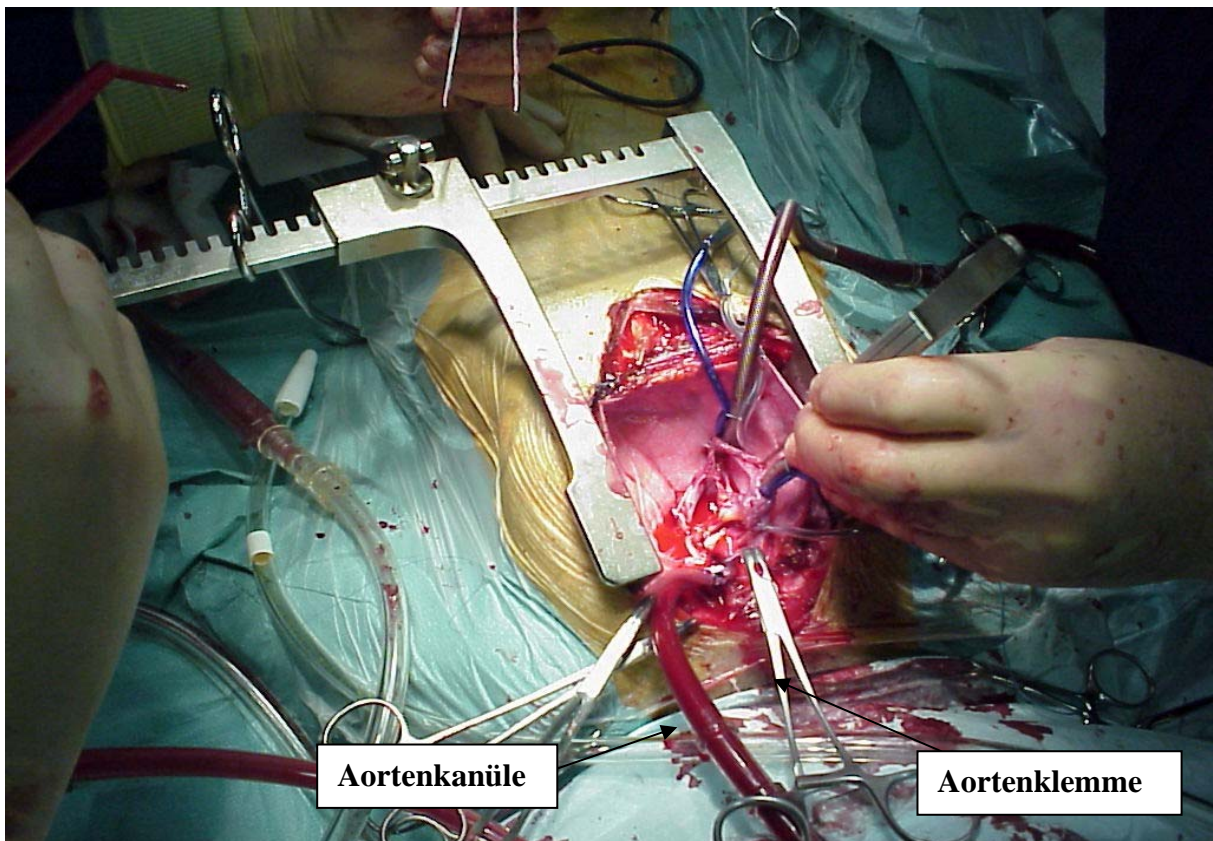


Abb. 2.7.: Paviansitus nach Exzision des nativen Herzens



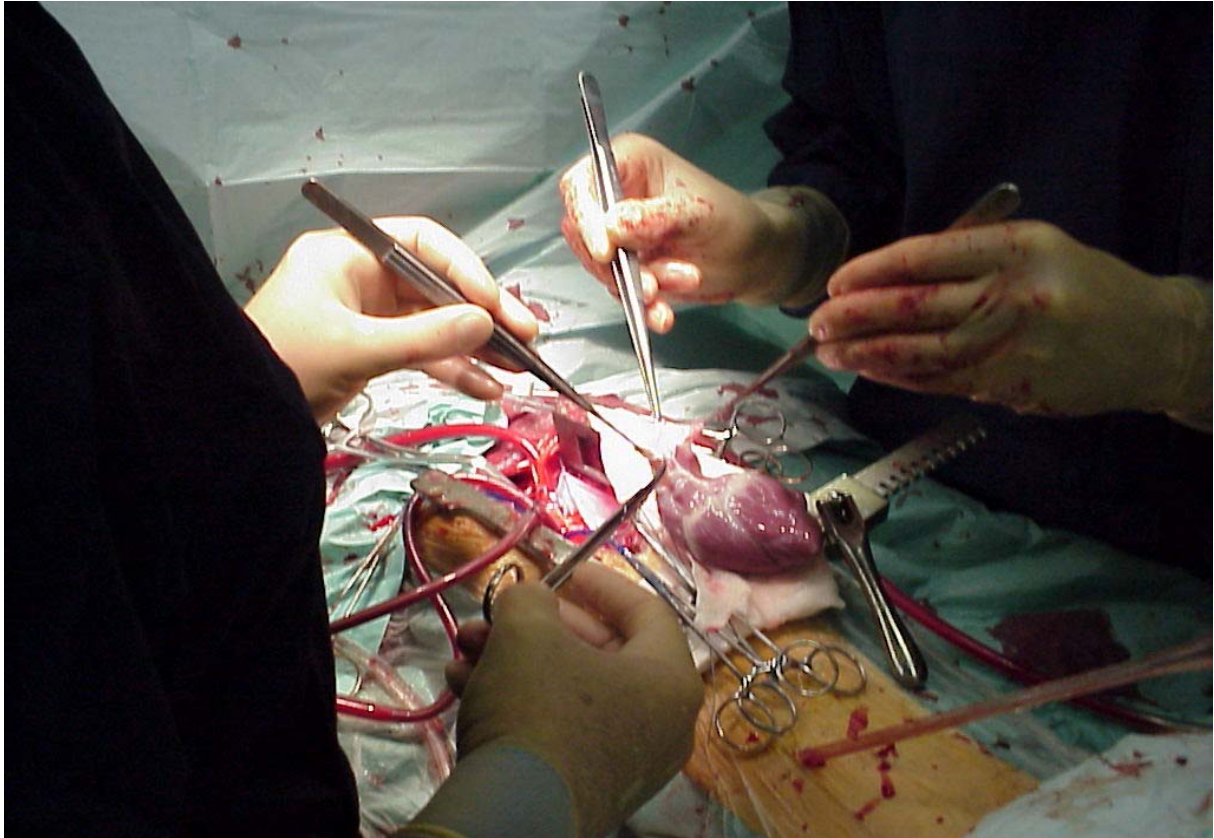


Abb. 2.8.: Präparation des Schweineherzens: Aorta und Pulmonalis werden auf die richtige Länge zugeschnitten

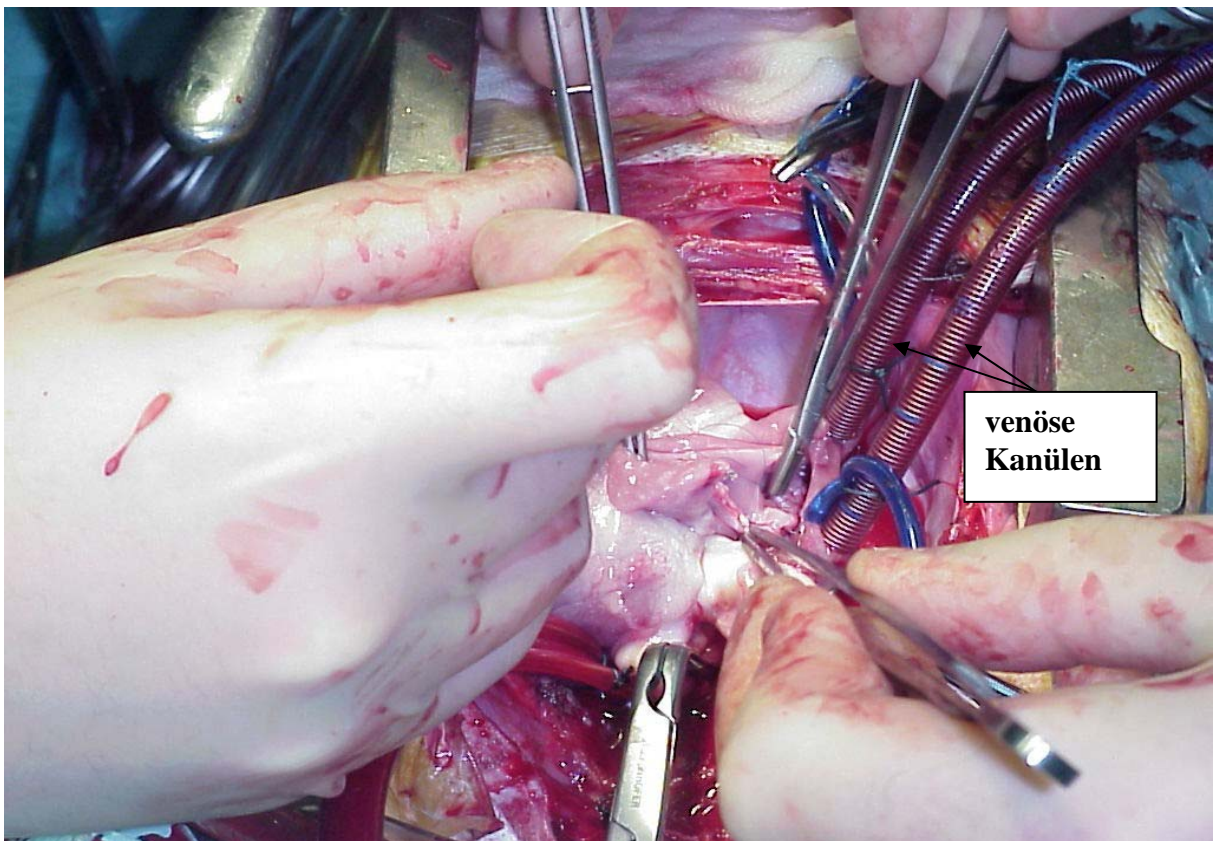


Abb. 2.9.: Anastomose des rechten Vorhofes



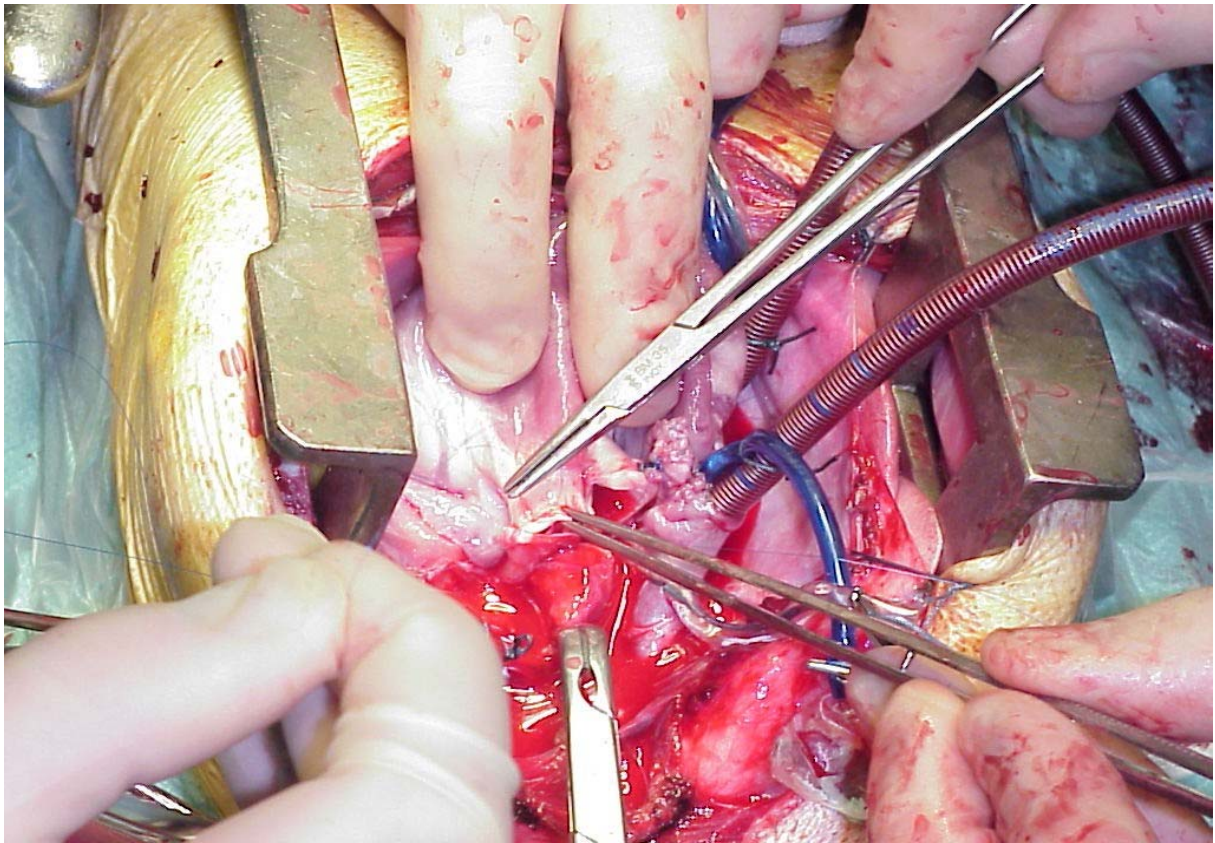


Abb. 2.10.: Anastomose des Truncus pulmonalis

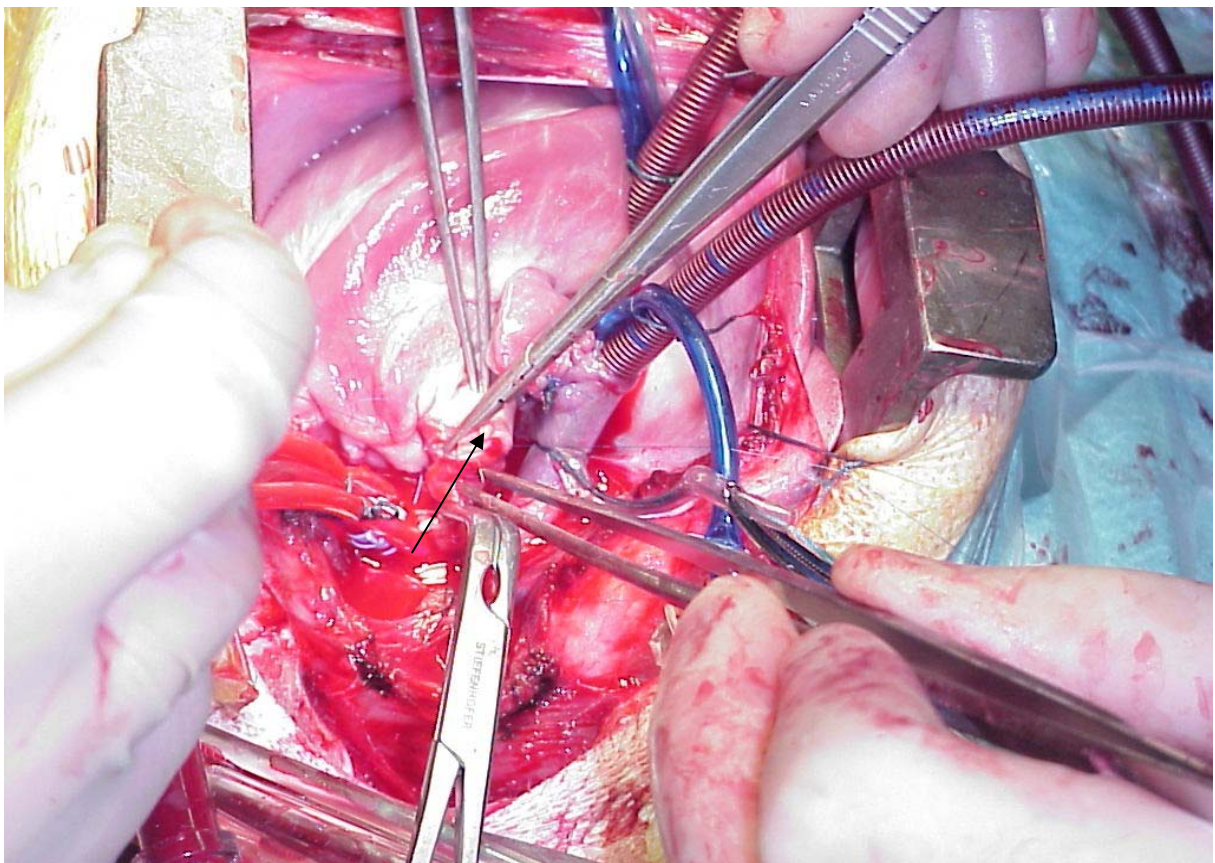


Abb. 2.11.: Anastomose der Aorta (Pfeil)

## 2.4. Postoperative Überwachung und Therapie

Ab dem ersten postoperativen Tag wurden die Tiere jeden Morgen zur Blutabnahme und klinischen Untersuchung mit 10 mg/kg Ketamin und 2 mg/kg Xylazinhydrochlorid analgosediert. Die Tiere wurden auf typische Zeichen einer Abstoßung wie Fieber, Gewichtszunahme, Ödeme und Dyspnoe hin untersucht. Es wurde ein EKG zur Diagnostik von abstoßungsbedingten Arrhythmien geschrieben und regelmäßig Echokardiographien zur Beurteilung der Pumpfunktion und Detektion eines Perikardergusses durchgeführt.

Grundsätzlich wurde versucht, die täglich benötigte Menge Blut so gering wie möglich zu halten. Am Institut für Klinische Chemie der LMU wurden die Tacrolimus- und Sirolimusspiegel bestimmt und ein Differenzialblutbild erstellt. Zusätzlich wurde täglich das zytoimmunologische Monitoring durchgeführt. Die Höhe der Anti-Schwein- und Anti- $\alpha$ -Gal-Antikörper (IgM und IgG) wurde mittels eines hämolytischen Assays bzw. ELISAS gemessen (Kap. 2.6.2. und 2.6.3.).

Die Tiere erhielten neben den Immunsuppressiva täglich 50 mg Diclofenac (Voltaren<sup>®</sup>, Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, Deutschland) zur postoperativen Schmerztherapie, 1500 mg Cefuroxim (Zinacef<sup>®</sup>, Glaxo-Smith Kline, München, Deutschland) als Infektionsprophylaxe, 100 ml einer 10% Glucoselösung, Vitamin-B-Komplex (JENAPHARM GmbH, Jena, Deutschland) sowie 4 mg Ondansetron (Zofran<sup>®</sup>, Glaxo Wellcome GmbH, Bad Oldesloe, Deutschland) und 10 mg Metoclopramid (Paspertin<sup>®</sup>, Solvay Arzneimittel GmbH, Hannover, Deutschland) gegen Übelkeit und Erbrechen. Die unter Immunsuppression bzw. Zytostatikatherapie auftretende Anämie wurde mit Eisen (ferrosanol<sup>®</sup> duodenal, SANOL GmbH, Monheim, Deutschland) und Erythropoietin (NeoRecormon<sup>®</sup>, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) einmal wöchentlich therapiert.





Abb. 2.12.: Pavian 10 postoperativ

## 2.5. Immunsuppressive Therapie

### METHYLPREDNISOLON

Methylprednisolon (Urbason<sup>®</sup>, Aventis Pharma GmbH, Bad Soden, Deutschland) ist ein Glukokortikoid (Nebennierenrindenhormon). Es hemmt die Transkription von Zytokinen (v.a. Interleukin-1 und -2) über nFκB, was die Suppression T-Zell-abhängiger Immunreaktionen erklärt.

Nebenwirkungen sind Steroiddiabetes, Osteoporose, Stammfettsucht, Magenulzera, Katarakt, Glaukom, Blutbildveränderungen (Thrombozytose, Eosinopenie, Lymphozytose), Petechien durch Kapillarbrüchigkeit, Hautatrophie, Bluthochdruck, Ödeme, Euphorie, Depression.

Die Dosierung betrug 1,0 mg/kg i.v. am OP-Tag sowie am ersten und zweiten postoperativen Tag. Danach wurde die Dosis jeden Tag um 0,05 mg/kg bis auf eine Erhaltungsdosis von 0,5 mg/kg reduziert.

### ATG (ANTI-THYMOZYTEN-GLOBULIN)

ATG-Fresenius S (Fresenius HemoCare Immune Therapy GmbH, Gräfelfing, Deutschland) wird aus Immunseren von Kaninchen, die vorher mit Lymphoblasten einer vom Menschen stammenden T-Zell-Linie immunisiert werden, gewonnen. Die enthaltenen polyklonalen Antikörper binden an Oberflächenantigene der humanen T-Lymphozyten und führen zu einer Depletion dieser Zellen durch Opsonisierung und Lyse durch Komplementaktivierung. Folgende Anwendungsmöglichkeiten bestehen:

1. Prophylaxe einer akuten Abstoßung in der unmittelbar postoperativen Phase nach Transplantation durch Verstärkung der Immunsuppression
2. Therapie der steroidresistenten Abstoßung

Nebenwirkungen sind anaphylaktoide Reaktionen (Fremdprotein) wie Blutdruckabfall und Urtikaria, erhöhtes Infektionsrisiko, Thrombozytopenie, Granulozytopenie, Fieber, Erbrechen und Durchfall.

Die Dosierung betrug 1-10mg/kg i.v. je nach Lymphozytenwert im Blut.

### CYCLOPHOSPHAMID

Cyclophosphamid (Endoxan<sup>®</sup>, ASTA Medica AWD GmbH, Frankfurt, Deutschland) ist ein alkylierendes Zytostatikum, das das korrekte Ablesen der Erbinformation auf der DNS unmöglich macht. Zum Einsatz kommt es bei Leukämien, Lymphomen und anderen malignen Tumoren sowie schweren Verläufen von Autoimmunkrankheiten.

Nebenwirkungen sind Leukozytopenie mit Infektionsgefahr, Thrombozytopenie mit Blutungsgefahr, Anämie, Übelkeit, Erbrechen, Durchfall sowie hämorrhagische Zystitis.

Das Dosierungsschema war 20 mg/kg i.v. einen Tag vor der Operation und jeweils 10 mg/kg i.v. am OP-Tag sowie am ersten und zweiten postoperativen Tag. Danach erfolgte die Dosierung entsprechend der Leukozytenzahl (untere Grenze  $2 \times 10^9/l$ ) bzw. der Titer der induzierten hämolytischen Anti-Schwein-Antikörper.

### CYCLOSPORIN A

Cyclosporin (Sandimmun<sup>®</sup>, Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, Deutschland) stammt von Pilzen (*Tolypocladium inflatum* Gams) und lagert sich in T-Lymphozyten an den zytosolischen Rezeptor Cyclophilin an. Der Komplex hemmt das Enzym Calcineurin, wodurch die T-Zell-Rezeptor-abhängige Signalkaskade blockiert und somit die Synthese des T-Zellwachstumsfaktors Interleukin-2 gehemmt wird.

Nebenwirkungen sind Bluthochdruck, Serumkreatininerhöhung, Nervenläsionen, Gingivitis, Hypercholesterinämie, Hypertrichose, Akne, Ödeme, Gastritis und Anämie.

Initial betrug die Dosierung 2 mg/kg und wurde im postoperativen Verlauf entsprechend eines Zielspiegels von 100-300 ng/ml modifiziert.

### TACROLIMUS (FK 506)

Das Makrolid-Antibiotikum Tacrolimus (Prograf<sup>®</sup>, Fujisawa GmbH, München, Deutschland) ist wie Cyclosporin ein Calcineurininhibitor. Der zytosolische Rezeptor heißt hier FKBP (FK-binding protein).

Nebenwirkungen sind Nephrotoxizität, Neurotoxizität (Tremor, Parästhesien), Hyperglykämie, Transaminasenerhöhung, Bluthochdruck, Anämie, Thrombozytopenie, Leukozytose, Pruritus, Gelenkschmerzen, erhöhtes Risiko für lymphoproliferative Erkrankungen u.a.

Die Dosierung betrug anfänglich 0,05-0,2 mg/kg i.v. bzw. 0,15-0,5 mg/kg i.m. und wurde dann einem Zielspiegel von 10-15 ng/ml angepasst.

### SIROLIMUS (RAPAMYCIN)

Sirolimus/Rapamycin (Rapamune<sup>®</sup>, Wyeth Europa Ltd, Maidenhead, UK) wird von dem Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* gebildet und ist ein Makrolid-Antibiotikum. Rapamycin bindet ebenfalls an FKBP. Dieser Komplex bindet an TOR (Target of Rapamycin)

und blockiert dadurch die Interleukin-2-Rezeptor- und CD-28-vermittelte Signalkaskade und somit die Stimulation der T-Zelle durch Interleukin-2, was die T-Zellproliferation hemmt. Darüber hinaus wird der Zellzyklus am Übergang von der G1- in die S-Phase blockiert.

Rapamycin wirkt zusätzlich inhibierend auf Wachstumsfaktoren nicht-immunologischer Zellen. Der antiproliferative Effekt auf glatte Muskelzellen trägt dazu bei, die chronische Transplantatvaskulopathie und Nephropathie (Groetzner 2004) zu verringern. Das Tumorwachstum ist im Tierexperiment reduziert (Guba 2002).

Nebenwirkungen sind Wundheilungsstörungen, Ödeme, Akne, Hyperlipidämie, Leuko- und Thrombozytopenie.

Die Dosierung startete mit 1,0-2,0 mg/kg p.o. bzw. 1,0-2,0 mg/kg i.m.. Als Zielspiegel wurden 8-12 ng/ml angestrebt.

### MYCOPHENOLATMOFETIL

Mycophenolatmofetil (CellCept<sup>®</sup>, Hoffmann-LaRoche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) ist ein Prodrug der Mycophenolsäure. Die Wirkung beruht auf einer Hemmung des Enzyms Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase, welches für die de-novo-Biosynthese von Purinen notwendig ist. Den Lymphozyten fehlt es dadurch an Guanin-Bausteinen für die DNS-Verdopplung bei der Mitose, wodurch ihre Proliferation inhibiert wird.

Nebenwirkungen sind Durchfall, Übelkeit, Erbrechen, Leukozytopenie und Schwindel.

Der Zielspiegel betrug 2-4 µg/ml.

### RITUXIMAB

Rituximab (MabThera<sup>®</sup>, Hoffmann-LaRoche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) ist ein monoklonaler CD-20-Antikörper, der an B-Lymphozyten bindet und sie eliminiert. Es wird routinemäßig eingesetzt zur Therapie des Non-Hodgkin-Lymphoms.

Nebenwirkungen sind in erster Linie anaphylaktoide Reaktionen, da es sich um Fremdeiweiß handelt.

Die Dosierung war 200mg/kg i.v. am Tag der Operation.

#### GAS 914

GAS 914 (Gal $\alpha$ (1,3)Gal $\beta$ (1,4)GlcNAc), Novartis Pharma AG, Basel, Schweiz) ist ein lösliches Typ II Gal $\alpha$ (1,3)Gal Trisaccharid mit einem Molekulargewicht von 500 kDa. Es ist in der Lage, Anti-Gal-Antikörper zu binden, so dass diese nicht mehr an das Transplantat binden können, wodurch die hyperakute Abstoßung vermieden wird.

GAS 914 hat keine Nebenwirkungen.

Die Dosierung betrug 1,0-5,0 mg/kg i.v. bzw. s.c. und wurde den Serumspiegeln der anti-Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper angepasst.

#### BERINERT<sup>®</sup>

Beriner<sup>®</sup> (ZLB Behring GmbH, Marburg, Deutschland) ist ein C1-Esterase-Inhibitor aus menschlichem Plasma. Die Komplementkaskade wird gleich zu Beginn blockiert.

Die wichtigsten Nebenwirkungen sind anaphylaktoide Reaktionen, Fieber und Thrombosen.

Die Dosierung betrug 500 Einheiten i.v..

#### ANTI-CD154-AK (ANTI-CD40-LIGAND)

CD40 auf B-Zellen interagiert mit CD40-Ligand (=CD154) auf T-Zellen. Die T-Zell-vermittelte B-Zell-Aktivierung und Antikörperproduktion kann durch anti-CD40-Ligand unterdrückt werden (sog. Co-Stimulationsblockade). Die Entwicklung und Produktion des Antikörpers erfolgte am GSF (Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit; neuer Name: Helmholtz Zentrum München).

Die wichtigste Nebenwirkung ist eine erhöhte Thromboseneigung.

Die Dosierung betrug 10 mg/kg i.v.

## **2.6. Spezielle Untersuchungen zur Diagnose einer Abstoßungsreaktion**

### **2.6.1. Zytoimmunologisches Monitoring**

Das zytoimmunologische Monitoring dient zur Diagnose einer akut zellulären Abstoßungsreaktion. Maßgeblich beteiligt an der Entwicklung des Verfahrens war Professor Dr. Dr. Hammer am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München (Hammer 1989).

Das Blut wurde über einen Ficoll-Hypaque-Gradienten mit der Dichte 1,077 nach der Methode von Böyum getrennt: 0,5ml heparinisiertes Vollblut wurden mit 0,5ml PBS und 0,5ml Ficoll in ein Eppendorf-tube gegeben und mit 3200U/min für 2 min zentrifugiert. Der Interphasering bestehend aus mononukleären Zellen wurde abpipettiert. Nach Zugabe von PBS wurden die Zellen zweimal mit 3200U/min 1 Minute lang gewaschen. Der Überstand wurde abpipettiert, und 200µl des mononukleären Konzentrats in eine Küvette der Zytozentrifuge gegeben. Die Zellen wurden 5 min bei 500U/min zentrifugiert. Die Zytopräparate wurden auf einem Objektträger 5 min luftgetrocknet und Anschließend nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt (May-Grünwald-Lösung für 3-4 min, 2 min Spülung mit destilliertem Wasser, Giemsa-Lösung (1/20) für 15-20 min, 2 min Spülung mit destilliertem Wasser).

Die Evaluation des mononukleären Konzentrats erfolgte durch Auszählen von 5x100 Zellen unter dem Mikroskop.

### **2.6.2. Anti-Schwein-Antikörper-Hämolyse-Test**

Der Anti-Schwein-Antikörper-Test dient zur Diagnose einer akut vaskulären (humoralen) Abstoßungsreaktion.

Es wurde ein Pool von normalem Humanserum aliquotiert und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Dieses Humanserum diente in jedem Assay als positive Kontrolle.

Die Pavianvollblutproben wurden 20 Minuten bei 4000U/min zentrifugiert. Die Sera wurden in Eppendorf-Röhrchen abpipettiert, bei  $56^{\circ}\text{C}$  für 30 Minuten hitzeinaktiviert und dann bei 17000G für 5 Minuten zentrifugiert.

Anschließend wurde von jeder Serumprobe eine Verdünnungsreihe mit Komplementfixationsverdünner (CFD) von 1:2,5 bis 1:1280 auf einer Mikrotiterplatte erstellt. Nach Zugabe von Schweineerythrozyten wurden die Platten bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 1 Stunde inkubiert und dabei automatisch geschüttelt.

Die Platten wurden dann nach Zugabe von 100 $\mu\text{l}$  CFD bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 500G zentrifugiert. Auf die entstandenen Pellets wurde nach Abgießen der Flüssigkeit erneut CFD (200 $\mu\text{l}$ ) gegeben und wieder bei 500G für 10 Minuten zentrifugiert.

Nach Abgießen der Flüssigkeit wurde Kaninchen-Komplement (Serotec, UK) zugegeben, für 1 Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert und dabei automatisch geschüttelt.

Anschließend wurde bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 500G zentrifugiert, 100 $\mu\text{l}$  des Überstands entnommen und in Photometerplatten abpipettiert.

Die photometrische Auswertung erfolgte bei 420nm in einem Plattenablesegerät (Tecem Spectra Rainbow, Madein, Österreich): für jede Probe wurde die Absorption berechnet und mit Hilfe eines Computerprogramms in „area under curve“-Einheiten übertragen.

Die gemessene Absorption der humanen Kontrollseren wurde als Standard mit 1000 AUC-Einheiten bewertet.

### **2.6.3. Anti- $\alpha$ -Gal-Antikörper-ELISA**

Eine Mikrotiterplatte (Nunc Polysorb 96 well flat bottom) wurde mit Gal $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-HSA (Dextra Labs, Reading, UK) und eine mit PBS (phosphate-buffered saline) über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  vorgecoatet.

Am Versuchstag wurden die Platten aus dem Kühlschrank genommen, ausgeschüttelt und einmal mit PBS (ICN, Costa Mesa, USA)-Tween 20 (Sigma, St.Louis, MO, USA)-aqua dest.-Lösung gewaschen.

Nach dem Blocken mit PBS-Tween 20-aqua dest.-Lösung wurden sie 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, danach ausgeklopft.

Die hitzeinaktivierten (56°C, 30 Minuten), verdünnten (1:2,5) Pavian- bzw. Humansera wurden in einer Verdünnungsreihe auf die Platten pipettiert und Anschließend 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Dann wurde die Peroxidase-konjugierte Antikörperlösung (goat anti-human IgG bzw. IgM, Dextra Labs, Reading, UK) 1:1000 verdünnt zugegeben.

Nach sieben Waschvorgängen wurde wieder 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Es folgte die Zugabe des Substrats Phenyldiamindihydrochlorid (Sigma, St.Louis, MO, USA), das die Farbreaktion induzierte, die nach 5 Minuten mit 1M Schwefelsäure fixiert wurde. Die Absorption wurde bei 490nm abgelesen. Mit Hilfe eines Computerprogramms wurden die „area under curve“-Werte für die Konzentrationen der anti- $\alpha(1,3)$ -Gal-IgG bzw. IgM-Antikörper berechnet, wobei unspezifisches Binden von Serumantikörpern an die Schale berücksichtigt wurde (Subtraktion der Werte für die mit PBS beschichtete Platte) und dem humanen Serumstandard der AUC-Wert 1000 zugeteilt wurde.

## **2.7. Bestimmung der Interleukin-8-Spiegel**

Die Bestimmung der Il-8-Konzentration erfolgte mit einem Instant-Elisa (Bender MedSystems GmbH, Wien, Österreich): Zu den bereits vorpräparierten Standardproben sowie zu den Pavianseren wurde destilliertes Wasser gegeben und für 2,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit bindet das in den Proben vorhandene Il-8 an die mit einem monoklonalen Il-8-Antikörper vorgecoatete Platte. Daraufhin bindet ein Biotin-



konjugierter polyklonaler Il-8-Antikörper an das Il-8 der Proben (``Sandwich``-Elisa). Streptavidin-Konjugat bindet den Biotin-konjugierten Il-8-Antikörper.

Nach drei Waschvorgängen wurde die Substratlösung zugegeben, die mit dem Streptavidin-Konjugat innerhalb von zehn Minuten zu einem farbigen Produkt reagiert, proportional zur Il-8-Konzentration in den Proben. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer säurehaltigen Lösung gestoppt und die Absorption mit einem Elisa-Lesegerät bei 450nm gemessen. Von sieben Affen-Il-8-Verdünnungen wurde eine Standardkurve angefertigt, und die Il-8-Konzentration der Proben in U/ml bestimmt.

## **2.8. Bestimmung der MCP-1-Spiegel**

Die Bestimmung der MCP-1-Konzentration erfolgte ebenfalls mit einem Instant-Elisa (Bender MedSystems GmbH, Wien, Österreich). Das Procedere ist analog zur Il-8-Bestimmung (s.o.). Die Ergebnisse wurden in pg/ml angegeben.

## **2.9. Bestimmung der TNF- $\alpha$ -Spiegel**

Die Bestimmung der TNF- $\alpha$ -Konzentration erfolgte mit einem konventionellen Elisa (Bender MedSystems GmbH, Wien, Österreich), der sich von den Instant-Elisas durch die Anzahl der Inkubationszeiten und Waschvorgänge und damit der Arbeitszeit unterscheidet. Die Ergebnisse wurden in U/ml angegeben.

## **2.10. Gruppeneinteilung nach Immunsuppressionsschema**

Die 12 Tiere wurden in 6 Gruppen mit jeweils 1 -3 Tieren eingeteilt. Dieses Vorgehen erlaubt keinerlei statistische Analyse, ist jedoch aufgrund der enormen Kosten jedes einzelnen Versuchs und zum Schutze der Paviane unvermeidlich und allgemein anerkannt. Die Ergebnisse können daher nur deskriptiv als Fallberichte dargestellt werden.

Gruppe 1 (PAV 1+3+4)	CyA, MMF, Steroide, GAS 914 i.v.
Gruppe 2 (PAV 2)	CyA, MMF, Steroide, GAS 914 i.v., Berinert
Gruppe 3 (PAV 5+6)	Tac i.v., Sir p.o., Steroide, ATG, GAS 914 i.v.
Gruppe 4 (PAV 7+8)	Tac i.v., Sir p.o., Steroide, ATG, GAS 914 i.v., Rituximab
Gruppe 5 (PAV 9+10+12)	Tac i.m., Sir i.m., Steroide, ATG, GAS 914 s.c., CyP
Gruppe 6 (PAV 11)	Tac i.m., Sir i.m., Steroide, ATG, GAS 914 s.c., CyP, anti-CD154-AK

Tab. 2.1.: Gruppeneinteilung (CyA=Cyclosporin A; MMF=Mycophenolatmofetil; Tac=Tacrolimus, ATG=Anti-Thymozyten-Globulin; Sir=Sirolimus; CyP=Cyclophosphamid; PAV=Pavian)

## 2.11. Endpunkte der Studie

Als Euthanasiekriterien galten in dieser Studie:

1. therapierefraktäre, finale Abstoßungsreaktion des Transplantates mit kardial verursachter massiver Einschränkung des Allgemeinzustandes
2. therapierefraktäre Infektionen
3. therapierefraktäre Medikamenten-Toxizitäten (z.B. Diarrhö, Blutungen)
4. Analgetika-induzierte Abweichungen vom natürlichen Verhalten
5. Verschlechterung des Allgemeinzustandes des Tieres, welche ein unzumutbares Leiden verursacht

Die Tiere wurden mit 10 mg/kg Ketaminhydrochlorid und 2-4 mg/kg Xylazinhydrochlorid i.m. tief sediert und einer Überdosis Pentobarbital (Narcoren®, Merial, Halbergmoos, Deutschland) euthanasiert.

## **2.12. Sektion**

Nach Thorakotomie wurde das Herz explantiert und jeweils eine Probe aller vier Herzkammern auf Korkplättchen in Gewebekleber (Tissue tek, Miles, USA) eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Der Rest des Herzens wurde in 4% gepuffertem Formalin konserviert. Genauso wurde mit Gewebeproben von Aorta, A. pulmonalis, Lunge, Leber, Niere, Dünndarm, Milz und Haut verfahren.

## **2.13. Pathologie**

Die komplette histopathologische Untersuchung wurde von einem in der Transplantation erfahrenen Pathologen durchgeführt.

Die Gewebeproben wurden in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin und Elastica van Gieson gefärbt. Die immunhistochemische Analyse wurde mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen humanes IgM (DAKO, Hamburg, Deutschland), humanes IgG (Biozol, Eching, Deutschland) und humane Myeloperoxidase (MPO) (DAKO, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Die Verdünnungen der primären Antikörper waren wie folgt:

IgM: 1:150, primäre Konzentration 11,9 g/l, 30 Minuten Mikrowellen-Vorbehandlung, target unmasting fluid (TUF; Quartett, Berlin, Deutschland)

IgG: 1:50, keine Vorbehandlung

MPO: 1:1500, primäre Konzentration 2,0 mg/ml, keine Vorbehandlung.

Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten bei Raumtemperatur. Zur Detektion der gebundenen primären Antikörper wurde die Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Technik unter Verwendung eines herkömmlichen Färbesets (LSB, DAKO, Hamburg, Deutschland) angewandt. Als negative Kontrolle wurde der primäre Antikörper durch Immunglobulin der Maus bzw. Verdünnungsmedium ersetzt. Hierbei konnte keine Färbung beobachtet werden.

Histomorphologische Läsionen wurden mit Hilfe eines semiquantitativen Klassifikationsschemas beschrieben. Den einzelnen Komponenten wurden je nach Intensität die Grade 0 (nicht vorhanden) bis 3 (stark) zugeordnet.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Überlebenszeiten und Todesursachen

Pavian Nr.	Überlebenszeit	Todesursache	CPB-Zeit (min)	Ischämiezeit (min)	APA präOP (AUC)	Anti- $\alpha$ -Gal-IgG präOP (AUC)	Anti- $\alpha$ -Gal-IgM präOP (AUC)
1	4 Stunden	Blutungskomplikation	310	100	-	-	-
2	2,5 Stunden	allergische Reaktion auf Berinert	125	60	1851	786	1212
3	5 Stunden	Maligne Hyperthermie	135	100	1800	761	2175
4	6,5 Stunden	Transplantatversagen	135	135	2579	1267	2277
5	20 Stunden	Maligne Herzerhythmusstörung	150	147	1258	924	1886
6	<b>9 Tage</b>	AVR	120	100	1892	2610	4472
7	7,5 Stunden	Transplantatversagen	120	90	3131	2385	3161
8	1 Tag	toxisches Lungenödem (Sirolimus) und HAR	120	100	91	173	735
9	5,5 Stunden	Transplantatversagen	150	140	274	400	584
10	<b>25 Tage</b>	AVR	120	100	102	274	215
11	20 Stunden	Lungenödem	129	65	2230	458	1998
12	<b>14 Tage</b>	AVR	163	69	3406	93	2201

CPB=cardiopulmonary bypass, APA=anti-pig-antibodies,  $\alpha$ -Gal=Galaktose  $\alpha(1,3)$ -Galaktose, IgG/M=Immunglobulin G/M, AUC=area under curve

Tab. 3.1.: Überlebenszeiten und Todesursachen sowie Bypass-, Ischämiezeit und präoperative Antikörpertiter

Von zwölf Pavianen überlebten vier länger als 24 Stunden:

Pavian 6 starb am 9. postoperativen Tag an einer akut-vaskulären Abstoßung. Die präoperativ hohen anti-Gal $\alpha(1,3)$ Gal-Antikörper-Titer wurden durch die Therapie mit GAS 914 suffizient reduziert. Am vierten postoperativen Tag kam es jedoch zu einem Anstieg der hämolytischen anti-Schwein-Antikörper, der therapeutisch nicht beherrscht werden konnte und am neunten Tag nach Transplantation in eine AVR mündete.

Pavian 8 wurde am 1. postoperativen Tag euthanasiert, da er aufgrund eines (wahrscheinlich Sirolimus induzierten) toxischen Lungenödems nicht extubiert werden konnte. In der pathologischen Untersuchung zeigte sich zusätzlich eine HAR.

Pavian 10 und 12, die beide niedrig dosiert Cyclophosphamid erhielten, überlebten 25 bzw. 14 Tage in gutem Allgemeinzustand, lebhaft und ohne Zeichen von Infektionen oder Malignomen. Beide unterlagen einer akut-vaskulären Abstoßung.

Die Todesursachen der Paviane, die weniger als 24 Stunden überlebten waren im Einzelnen:

#### Pavian 1:

Pavian 1 starb an einem Volumenmangelschock nach einer Blutungskomplikation. In der Pathologie ergab sich kein Hinweis auf eine hyperakute Abstoßungsreaktion.

#### Pavian 2:

Pavian 2 hatte sowohl an der Herz-Lungen-Maschine als auch danach einen extremen Volumen- und Katecholaminbedarf durch periphere Vasodilatation. Neu getestet wurde bei diesem Versuch der C1-Esterase-Inhibitor Berinert®, der allergrößter Wahrscheinlichkeit nach der Auslöser für diese anaphylaktische Reaktion war. Das Tier verstarb noch auf dem OP-Tisch an einer therapierefraktären Vasoplegie. Die pathologische Untersuchung des Herzens ergab hypereosinophile Areale und eine ischämisch zirkulatorische Schädigung, aber keinen Hinweis auf hyperakute Abstoßungsreaktion.

#### Pavian 3:

Bei Pavian 3 kam es durch einen Defekt an der Thermoregulierung der Herz-Lungen-Maschine zu einer Hyperthermie. Bei Verdacht auf Hirntod und sehr hohem Katecholaminbedarf wurde der Versuch eingestellt, und das Tier euthanasiert.

#### Pavian 4:

Bei Pavian 4 begann sich das Herz bereits in der Reperfusionsphase fleckig-livide zu verfärben. In der pathologischen Untersuchung zeigten sich interstitielle Ödeme und

Hämorrhagien, es fehlten jedoch Fibrinthromben in den Venolen und Endothelzellaktivierung als klassische Zeichen einer hyperakuten Abstoßungsreaktion.

#### Pavian 5:

Pavian 5 starb 20 Stunden nach Eröffnen der Aortenklammer an Kammerflimmern im Käfig. Bei der Sektion hatte er ein alveoläres Lungenödem und ischämisch wirkende Nekrosen im Myokard ohne Zeichen einer hyperakuten Abstoßungsreaktion.

#### Pavian 7:

Pavian 7 starb nach 8 Stunden an Herz-Kreislauf-Versagen. Die Sektion ergab eine zirkulatorisch ischämische Schädigung mit interstitiellem Ödem und Hämorrhagien, jedoch ohne ausreichenden Anhalt für eine hyperakute Abstoßung.

#### Pavian 9:

Pavian 9 starb 20 Stunden nach Transplantation an therapierefraktärem Herz-Kreislauf-Versagen. Zusätzlich zu interstitiellem Ödem und Hämorrhagien fand sich hier eine geringe Endothelzellaktivierung und vereinzelt venuläre Thrombi, so dass eine beginnende hyperakute Abstoßungsreaktion nicht vollständig auszuschließen ist.

#### Pavian 11:

Pavian 11 erhielt zur Co-Stimulationsblockade einen anti-CD154-Antikörper. Der Pavian verstarb an einem Lungenödem. Bei jeder Applikation des Antikörpers kam es zu Hypotonie und Tachykardie. Es ist davon auszugehen, dass das Fremdeiweiß eine Endotoxinreaktion bewirkte. Die anaphylaktoide Symptomatik konnte auch durch die vorangestellte Gabe von Antihistaminika und Steroiden nicht suffizient verhindert werden, weshalb wir von der anti-CD154-Therapie wieder Abstand nahmen. Die pathologische Untersuchung des Herzens ergab ischämisch zirkulatorische Nekrosen ohne ausreichenden Anhalt für eine hyperakute Abstoßung.

### 3.2. Gewichte

Die Erfahrung hat gezeigt, dass Schweineherzen im Vergleich zum Körpergewicht des Schweines größer und schwerer sind als Pavianherzen im Vergleich zum Körpergewicht des Pavians (Schmoeckel 1998, Yang 2006). Aus diesem Grunde wurden initial Schweine verwendet, die leichter waren als die Empfängerpaviane. Durch das rasante Wachstum (>800% in 6 Monaten) waren aber bei einigen Versuchen nur schwerere Schweine verfügbar. Überraschenderweise waren dies die erfolgreichsten Versuche. Wir führen dies auf ein größeres Herzzeitvolumen und damit eine bessere Organperfusion in der kritischen Phase unmittelbar postoperativ zurück.

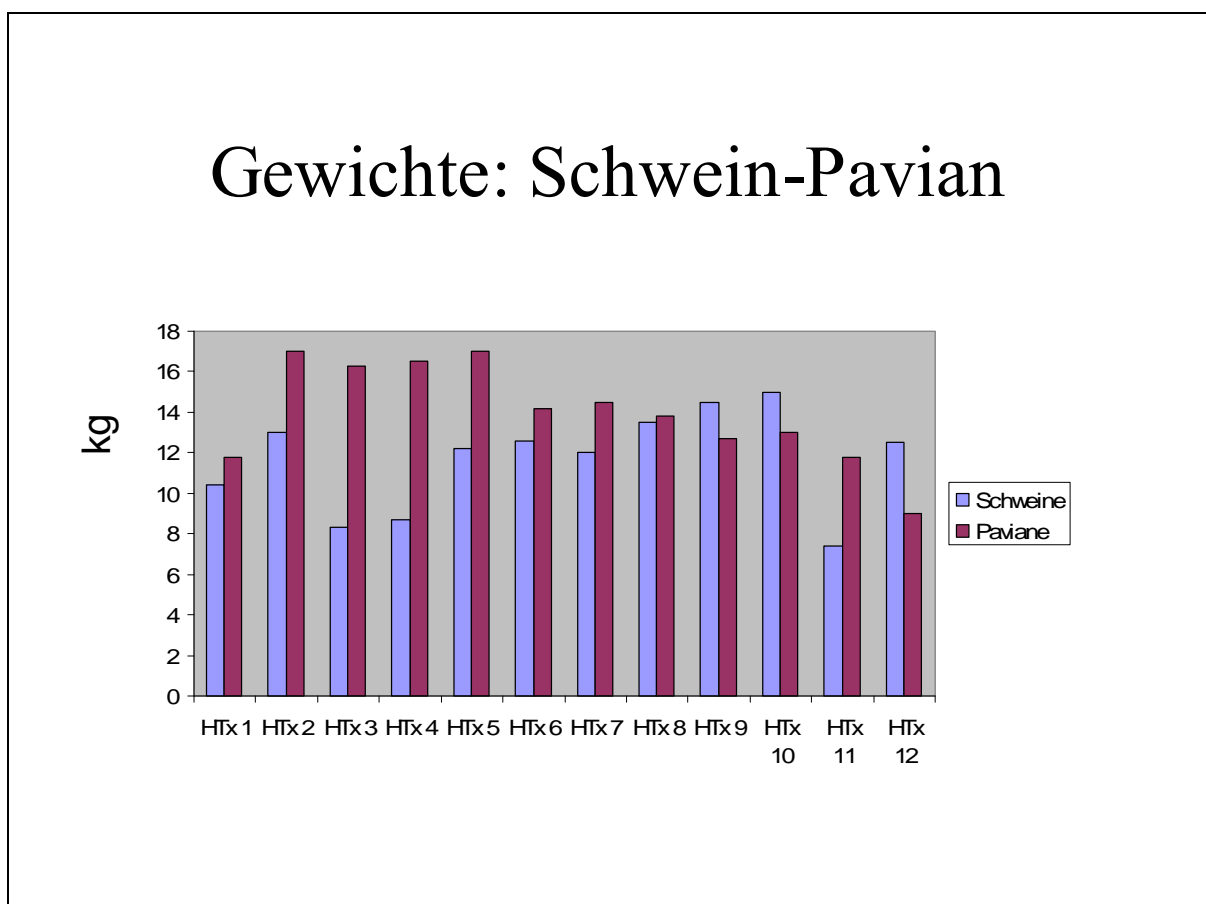


Abb. 3.1.: Vergleich der Körpergewichte von Schwein und Pavian



### **3.3. hDAF-Expression auf dem Endothel**

Die Expression des hDAF-Transgens auf dem Endothel wurde präoperativ mittels Ohrbiopsien untersucht und mit Grad 0 (keine Expression) bis Grad 3 (sehr starke Expression) beziffert. Nach Versuchsende wurde auch die Expression auf dem Koronarendothel evaluiert. Es zeigte sich, dass beide Proben eng miteinander korrelieren.

Bei allen Pavianen lag eine Expression Grad 2 (stark) bis 3 (sehr stark) vor.

### **3.4. Anti- $\alpha$ -Gal-Antikörper-Titer**

Die Titer sowohl der IgM als auch der IgG anti-Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper wurden am Tag der Operation durch die Gabe von GAS 914 in fast allen Fällen unabhängig vom Ausgangstiter drastisch reduziert. Entscheidend ist, dass die Titer vor Öffnen der Aortenklemme, d.h. vor dem ersten Kontakt des Pavianblutes mit dem Schweineendothel reduziert werden (Abb. 3.2. und 3.3.). Dies geschah bei Pavian 8, 9 und 10 durch Applikation von GAS 914 bereits am Vortag der Operation, weshalb sie bei OP-Beginn niedrige Titer aufweisen (Abb. 3.4. und 3.5.). Bei den anderen Tieren wurde GAS 914 zum ersten Mal an der extrakorporalen Zirkulation während der Transplantation verabreicht. Auch dies war ausreichend, um die Titer rechtzeitig vor Reperfusion signifikant zu reduzieren.

Postoperativ konnten durch die tägliche Applikation von GAS 914 die Titer bis auf zwei Ausnahmen bei Pavian 12 sehr niedrig gehalten werden.

## Anti- $\alpha$ -Gal-Antikörper: IgG

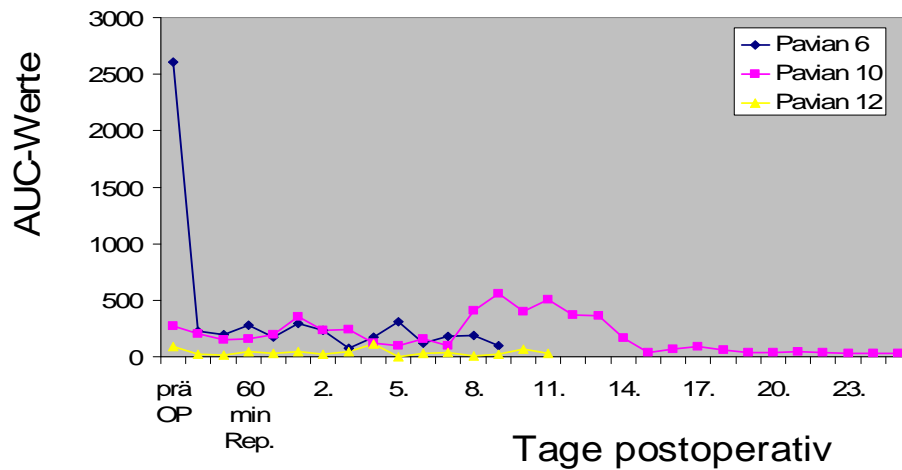


Abb. 3.2.: Verlauf der Anti- $\alpha$ -Gal-Antikörper-Titer (IgG) in AUC-Einheiten (AUC = area under the curve einer Verdünnungsreihe, humanen Kontrollseren wird der Wert 1000 zugeordnet)

## Anti- $\alpha$ -Gal-Antikörper: IgM

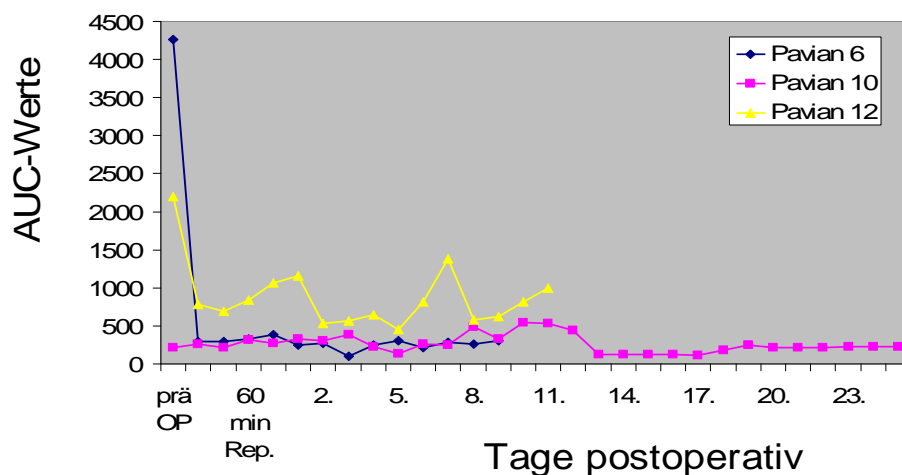


Abb. 3.3.: Verlauf der Anti- $\alpha$ -Gal-Antikörper-Titer (IgM) in AUC-Einheiten (AUC = area under the curve einer Verdünnungsreihe, humanen Kontrollseren wird der Wert 1000 zugeordnet)

## Anti- $\alpha$ -Gal-Antikörper: IgG

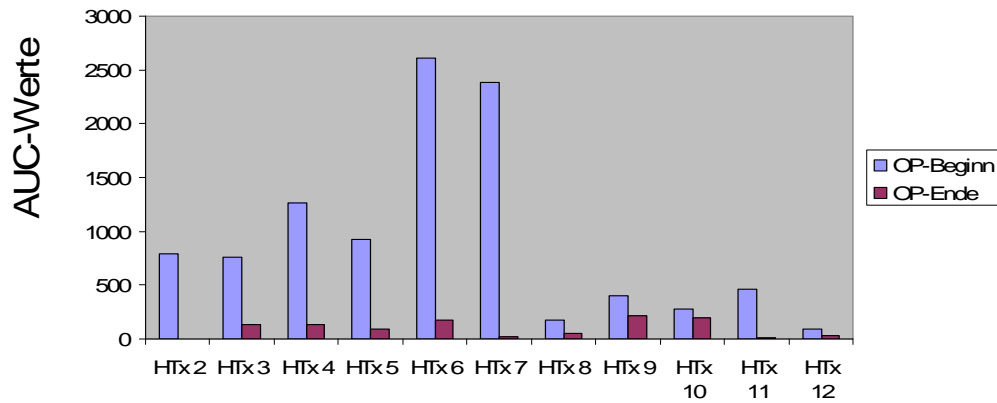


Abb. 3.4.: Anti- $\alpha$ -Gal-Antikörper-Titer (IgG) bei OP-Beginn und OP-Ende in AUC-Einheiten (humanen Kontrollseren wird der Wert 1000 zugeordnet)

## Anti- $\alpha$ -Gal-Antikörper: IgM

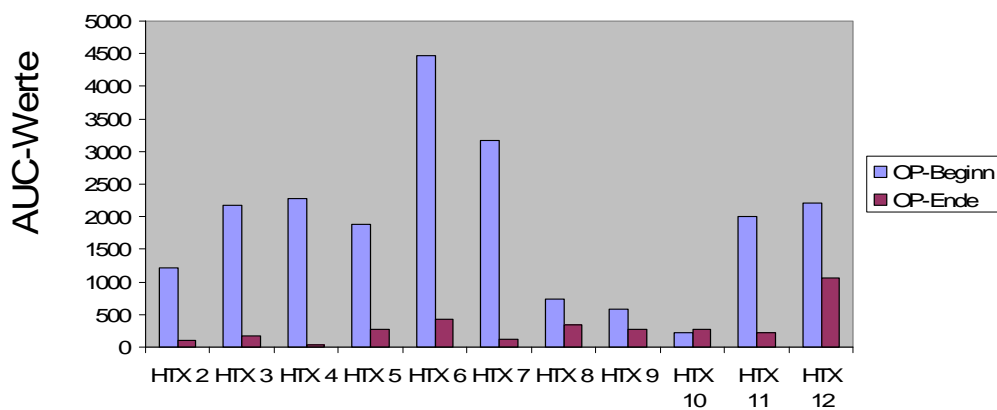


Abb. 3.5.: Anti- $\alpha$ -Gal-Antikörper-Titer (IgM) bei OP-Beginn und OP-Ende in AUC-Einheiten (humanen Kontrollseren wird der Wert 1000 zugeordnet)

### 3.5. Anti-Schwein-Antikörper-Titer

Die hämolytischen Anti-Schweine-Erythrozyten-Antikörper konnten initial unabhängig vom Ausgangstiter, der von Tier zu Tier stark variierte, durch GAS 914 ebenfalls stark reduziert werden. Sie stiegen jedoch im weiteren postoperativen Verlauf trotz der Gabe von GAS 914 an (siehe Abb. 3.6. und 3.7.). Dies ist ein Hinweis darauf, dass es sich hierbei um induzierte zytotoxische Antikörper anderer Spezifitäten als  $\text{Gala}(1,3)\text{Gal}$  handelt (sog. *anti-non-Gala(1,3)Gal-Antikörper*). Diese Antikörperanstiege wurden mit ATG behandelt, was jedoch nur bei Pavian 12 zur Reduktion führte. Bei den Pavianen 6 und 10 stiegen die Titer trotz ATG weiter an.

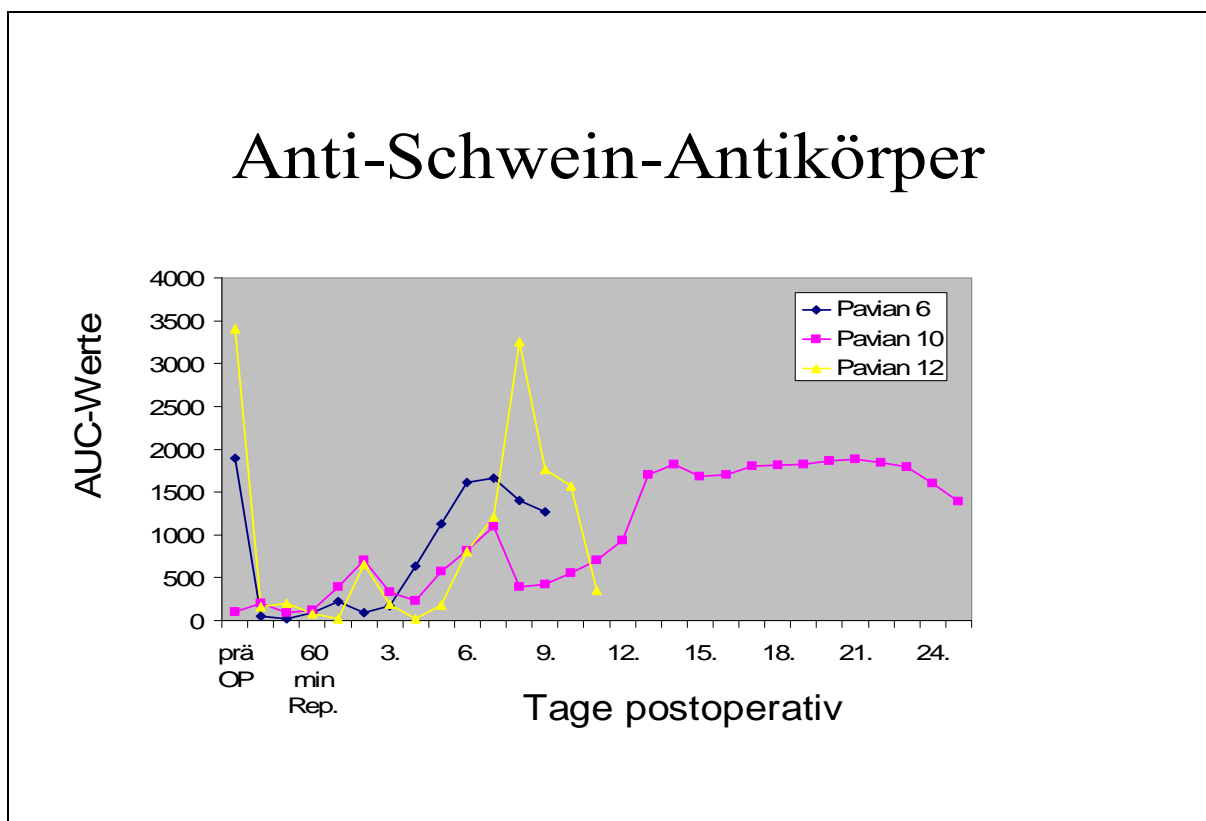


Abb. 3.6.: Verlauf der Anti-Schwein-Antikörper-Titer in AUC-Einheiten (AUC = area under the curve einer Verdünnungsreihe, humanen Kontrollseren wird der Wert 1000 zugeordnet)

# Anti-Schwein-Antikörper

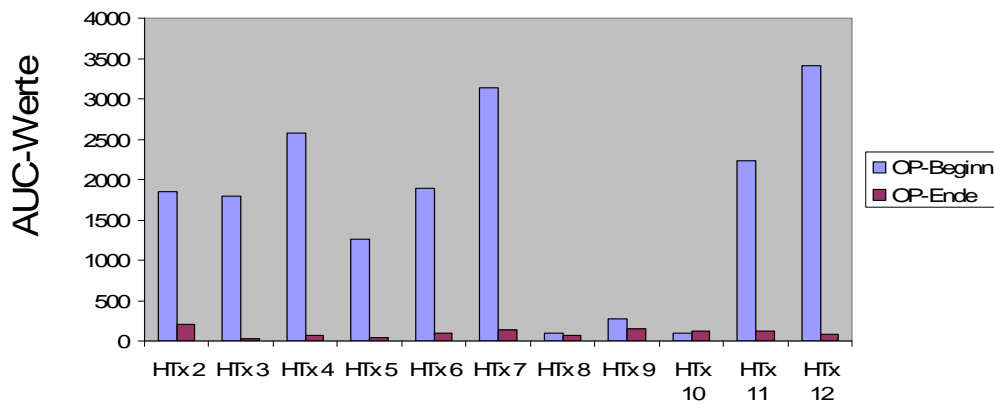


Abb. 3.7.: Anti-Schwein-Antikörper-Titer bei OP-Beginn und OP-Ende in AUC-Einheiten (AUC = area under the curve einer Verdünnungsreihe, humanen Kontrollseren wird der Wert 1000 zugeordnet)

## 3.6. Zytoimmunologisches Monitoring

Mit Hilfe des zytoimmunologischen Monitorings lässt sich eine akute Abstoßungsreaktion nicht-invasiv diagnostizieren. In der Klinik kann das Verfahren alternativ zur rechtsventrikulären Endomyokardbiopsie eingesetzt werden. Letztere stellt jedoch nach wie vor den Goldstandard in der Diagnostik der akuten Abstoßungsreaktionen dar. Wir führten ein zytoimmunologisches Monitoring bei den drei länger überlebenden Pavianen durch.

Wenn keine Abstoßungsreaktion vorliegt, finden sich ca. 60% Monozyten, 40% normale Lymphozyten und keine aktivierten Lymphozyten oder -blasten. Bei einer akut-zellulären bzw. humoralen Abstoßungsreaktion steigt der Anteil von aktivierten Lymphozyten und -blasten. Bei Pavian 10 beispielsweise traten am 14. postoperativen Tag im peripheren Blut Lymphoblasten und aktivierte Lymphozyten auf (Abb. 3.9.). Parallel hierzu entwickelte sich ein Anstieg der Anti-Schwein-Antikörper (Abb. 3.6.) und damit eine humorale Abstoßung.

# Zytoimmunologisches Monitoring

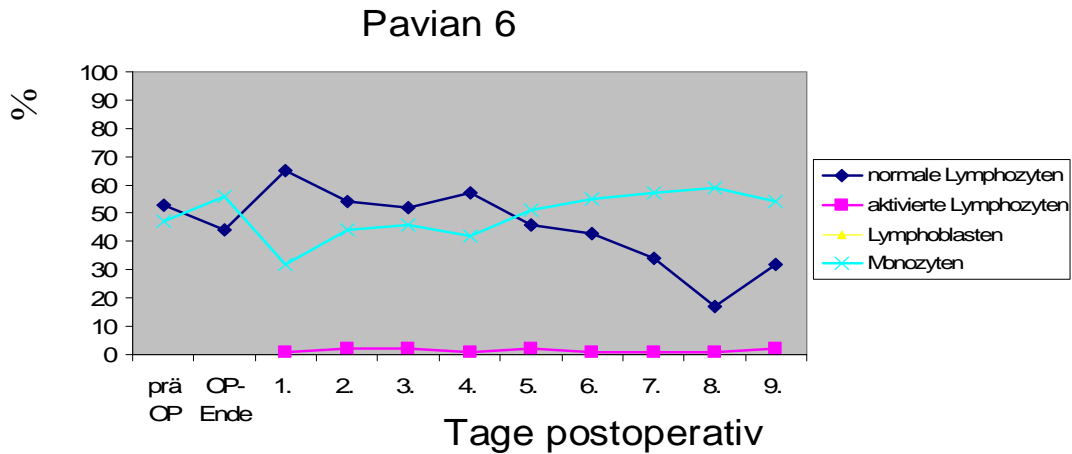


Abb. 3.8.: Zytoimmunologisches Monitoring von Pavian 6; dargestellt sind die Prozentanteile der Zellen des mononukleären Konzentrats

# Zytoimmunologisches Monitoring

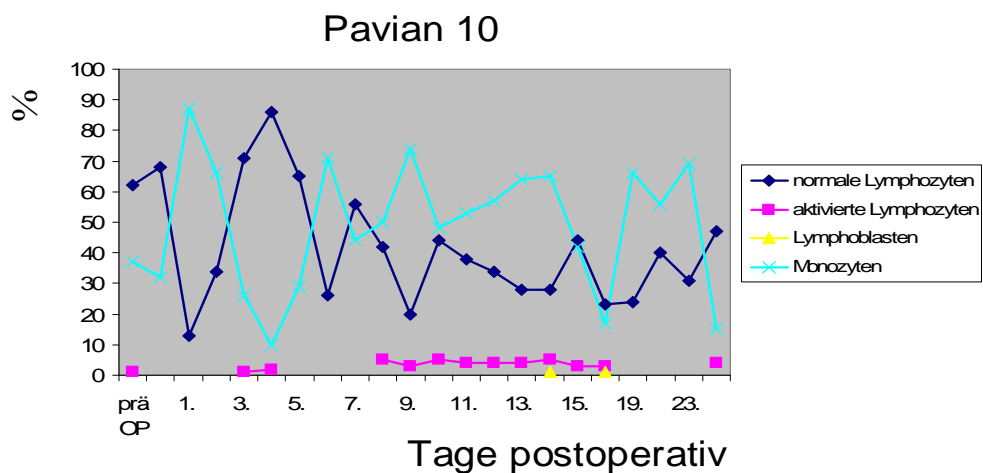


Abb. 3.9.: Zytoimmunologisches Monitoring von Pavian 10; dargestellt sind die Prozentanteile der Zellen des mononukleären Konzentrats; Beginn einer humoralen Abstoßung am 14. Tag

# Zytoimmunologisches Monitoring

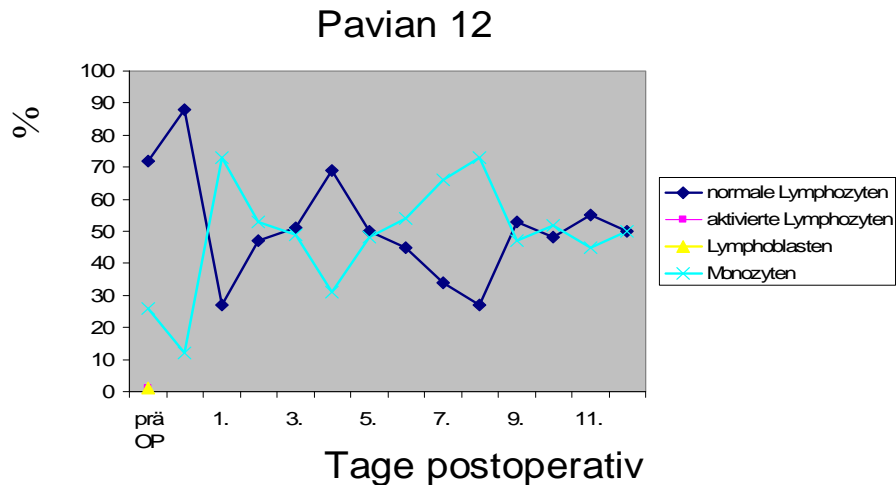


Abb. 3.10.: Zytoimmunologisches Monitoring von Pavian 12; dargestellt sind die Prozentanteile der Zellen des mononukleären Konzentrats

## 3.7. Spiegel der Immunsuppressiva

Es handelt sich bei den Spiegeln der Immunsuppressiva um 24-Stunden-Spiegel. Die gesamte Tagesdosis wurde einmalig morgens appliziert, um das Tier nicht zweimal in Kurznarkose versetzen zu müssen. Bei Pavian 6 wurde Tacrolimus intravenös und Sirolimus peroral gegeben, bei Pavian 10 und 12 beides intramuskulär. Die intramuskuläre Applikation erbrachte bei Sirolimus durchwegs suffiziente Spiegel, während dies mit der Zufuhr über die Magensonde aufgrund ungenügender Resorption nicht gelang (Abb. 3.11.). Die Tacrolimusspiegel konnten durch die intramuskuläre Injektion (Pavian 10 und 12) besser eingestellt werden als durch eine intravenöse Applikation (Pavian 6). Eine wie in der Klinik am Patienten zum direkt postoperativen Erreichen der Zielspiegel übliche intravenöse Verabreichung über einen Perfusor kann bei einem wachen Pavian nicht durchgeführt werden.

Anzumerken ist, dass zu hohe Tacrolimusspiegel bei Pavianen weniger nephrotoxisch sind als bei Menschen.

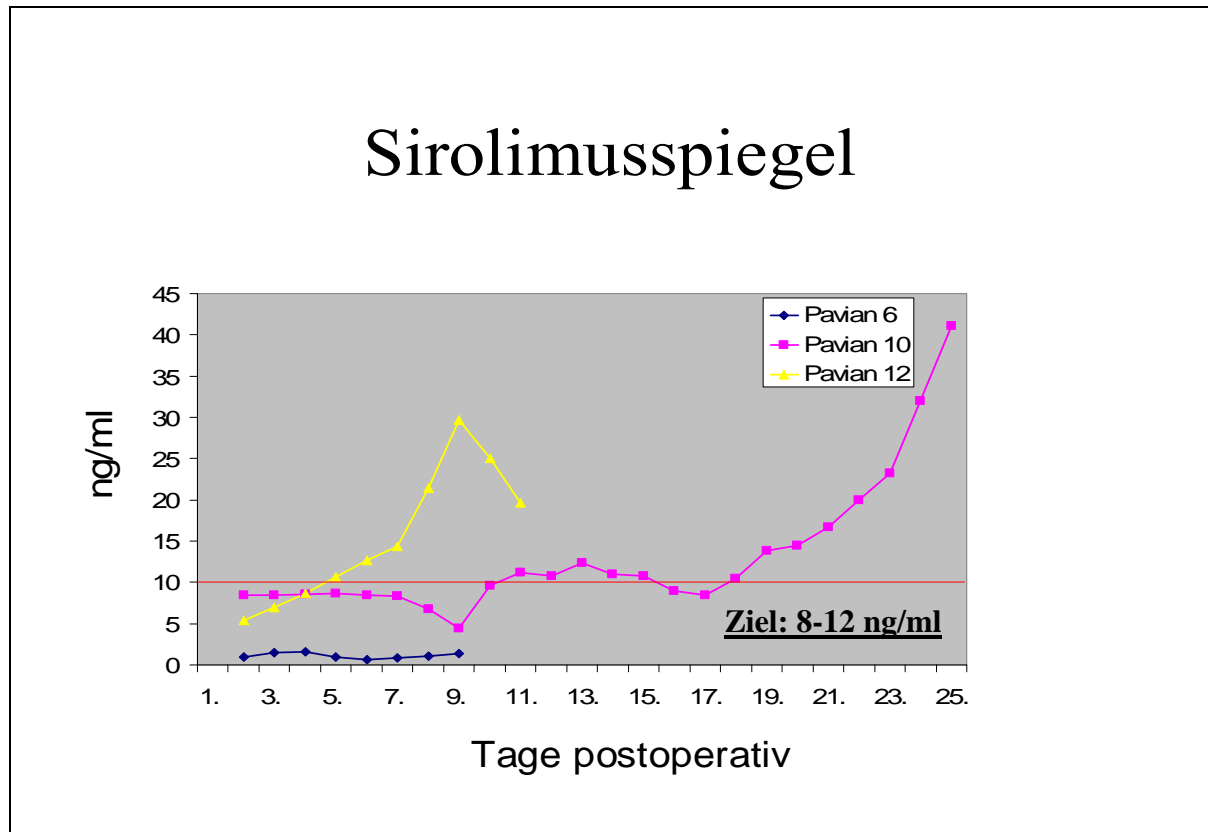


Abb. 3.11.: Verlauf der Sirolimusspiegel (Ziel: 8-12 ng/ml)



# Tacrolimusspiegel

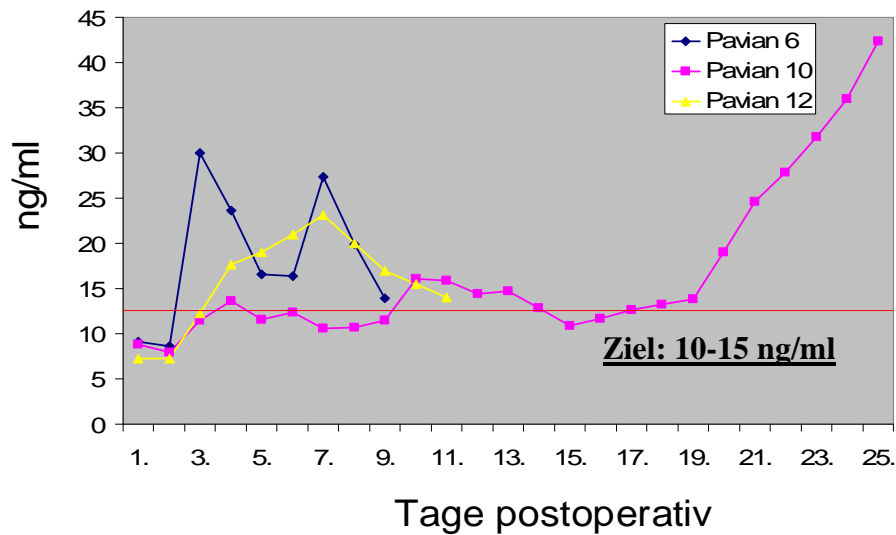


Abb. 3.12.: Verlauf der Tacrolimusspiegel (Ziel: 10-15 ng/ml)

## 3.8. Leukozyten

Es wurde versucht, die Leukozytenzahl unter 2000/ $\mu$ l zu halten. Bei den Pavianen 10 und 12 gelang dies mit Hilfe von Cyclophosphamid. Dem Zytostatika-induzierten Abfall der Leukozytenzahl ging in allen Fällen ein Anstieg unmittelbar nach der Operation voraus, der durch die extrakorporale Zirkulation verursacht war. Die künstlichen Oberflächen der Schläuche bewirken eine systemische Inflammation.

# Leukozyten

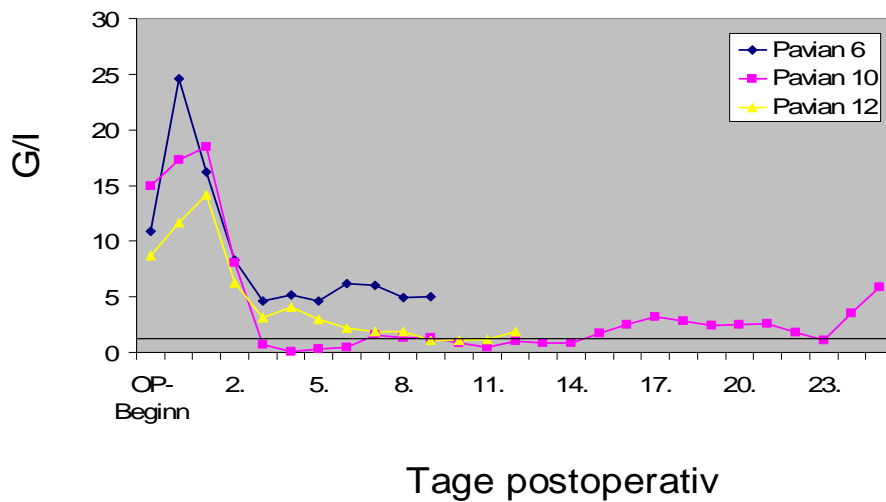


Abb.3.13.: Leukozytenverlauf (Zielwert: 2000/ $\mu$ l)

## 3.9. Lymphozyten

Der Normwert der Lymphozyten beträgt 25 – 40 % der Gesamtleukozyten. Um Abstoßungsreaktionen zu verhindern war unser Zielwert < 20 %. Das Verhältnis sollte zugunsten der Granulozyten und Monozyten verschoben werden, so dass eine Abwehr gegen bakterielle Infektionen möglich war. Bei den Pavianen 6 und 10 gelang dies bis auf wenige Ausnahmen fast immer (Abb. 3.14.).

# Lymphozyten

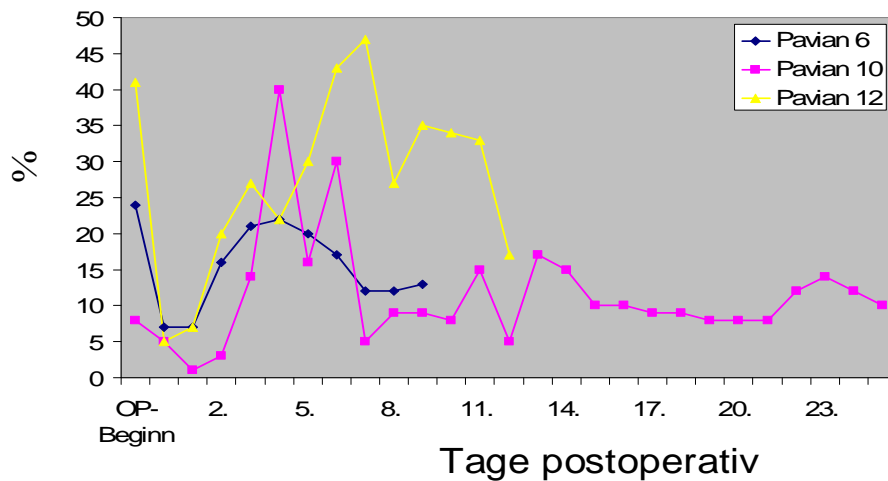


Abb. 3.14.: Lymphozytenverlauf (Ziel: < 20 % der Leukozytenzahl)

## 3.10. Hämoglobin

Durch Verwendung eines cell-saver-Saugers konnte der perioperative Hämoglobinabfall, der in erster Linie durch die Hämodilution an der extrakorporalen Zirkulation verursacht war, ohne Gabe von Blutprodukten in der Regel auf 2 g/dl beschränkt werden (Abb. 3.15.).

Im weiteren Verlauf war der Abfall des Hämoglobinwertes durch die immunsuppressiven Medikamente bedingt, die toxisch auf das Knochenmark wirken. Es wurde versucht, mit Gabe von Eisenpräparaten und Erythropoietin der Anämie entgegenzuwirken, was besonders bei Pavian 10 gut gelang (Abb. 3.16.). Bei Pavian 12 stand erstmalig ein autologes Erythrozytenkonzentrat zur Verfügung, welches im Deutschen Primatenzentrum Göttingen hergestellt worden war.

# Hämoglobin

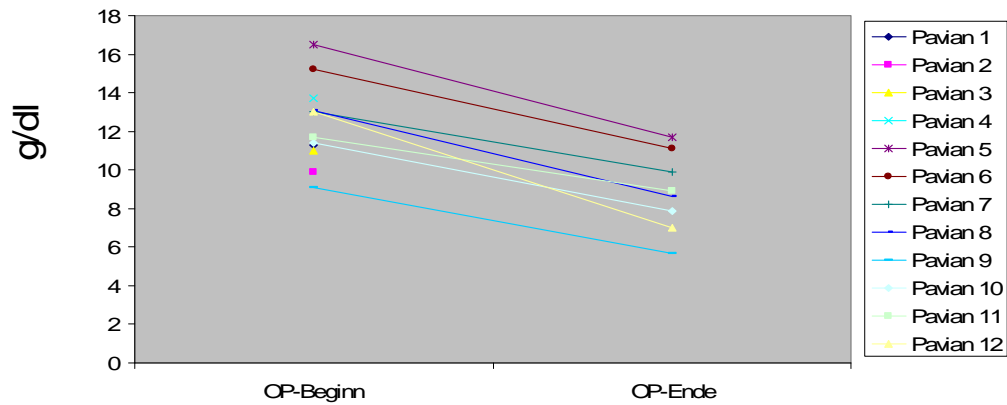


Abb. 3.15.: Abfall des Hämoglobinwertes durch die Operation mit extrakorporaler Zirkulation

# Hämoglobin

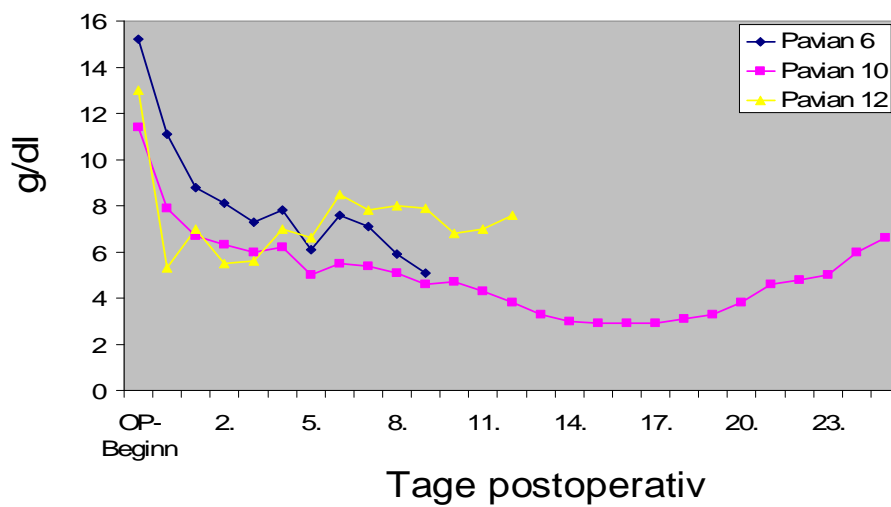


Abb. 3.16.: Abfall des Hämoglobinwertes durch die Immunsuppressiva

### 3.11. TNF- $\alpha$ , MCP-1 und Interleukin-8

TNF- $\alpha$ , Il-8 und MCP-1 können als Marker für die Endothelzellaktivierung Typ 2 im Rahmen der akut-vaskulären Abstoßungsreaktion herangezogen werden.

Die Abbildungen 3.17., 3.18. und 3.19. zeigen eine phasenweise ablaufende Endothelzellaktivierung mit intermittierenden Peaks. Bei Pavian 6 stiegen die Anti-Schwein-Antikörper-Titer vom 4. bis 7. postoperativen Tag an. Dies bedingte eine Endothelzellaktivierung, die wiederum an erhöhten TNF- $\alpha$ , MCP-1 und Il-8-Spiegeln im Serum ablesbar war (jeweils blaue Kurve in Abb. 3.17., 3.18. und 3.19.).

Die ELISA-Untersuchungen sind sehr sensitiv, aber nicht sehr spezifisch: auch bei Infektionen und Entzündungen anderer Genese sind erhöhte Werte der Mediatoren im Serum messbar, sodass deren Interpretation immer im Zusammenhang mit den Titern der Anti-Schwein-Antikörper stattfinden muss.

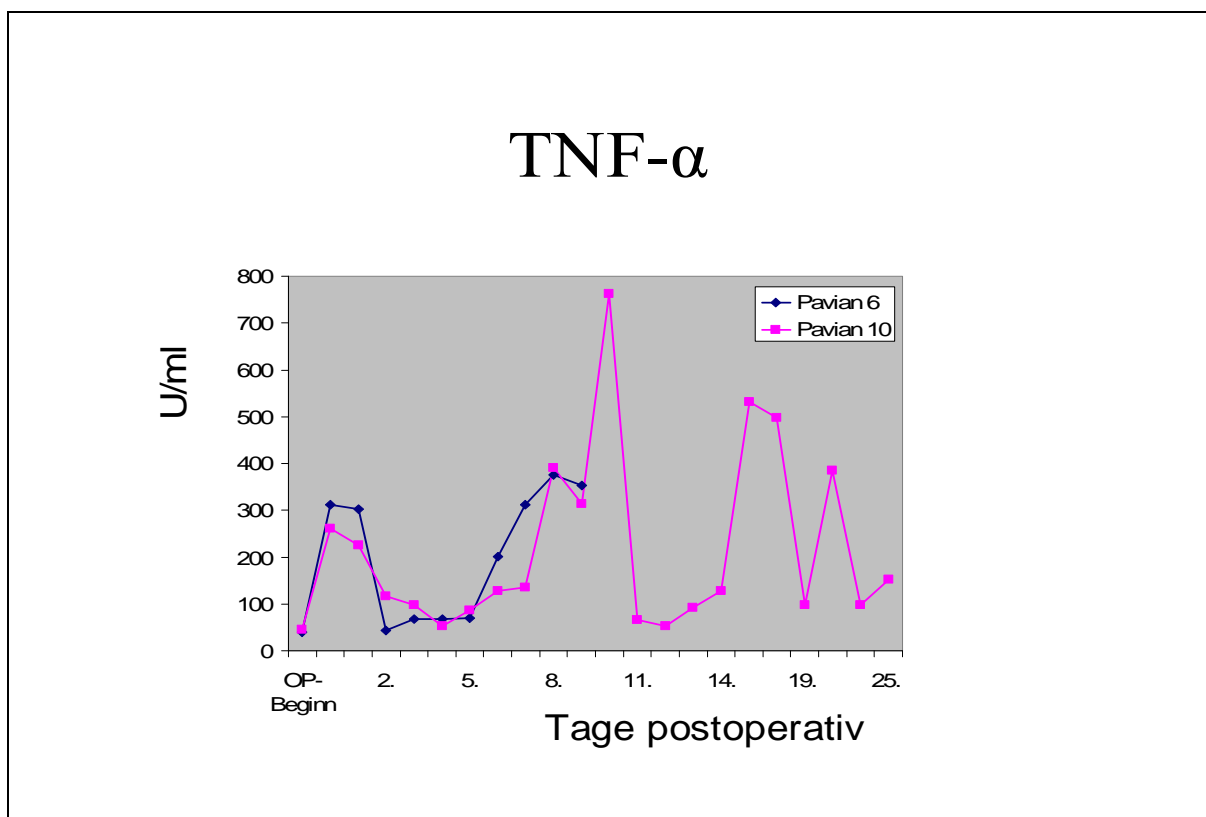


Abb. 3.17.: TNF- $\alpha$ -Verlauf (TNF=Tumor-Nekrose-Faktor)

# MCP-1

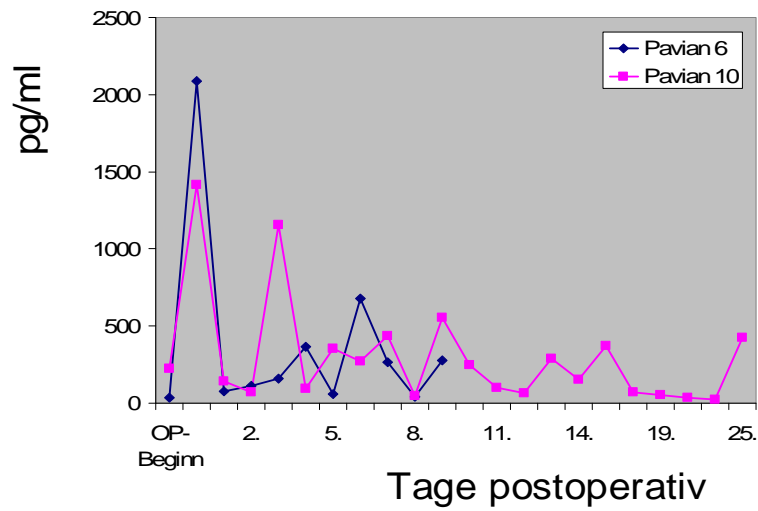


Abb. 3.18.: MCP-1-Verlauf (MCP=Monozyten chemotaktisches Protein)

# Interleukin-8

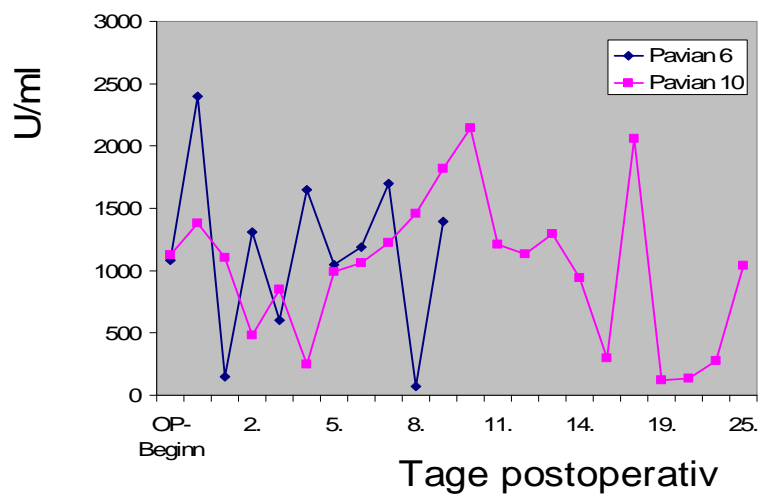


Abb. 3.19.: Interleukin-8-Verlauf

### 3.12. CK und CK-MB

Die Creatinkinase als Marker der myozytären Schädigung war unmittelbar nach der Operation stark erhöht. Dies ist auf den Ischämie-Reperfusionsschaden zurückzuführen. Sie fiel in den Folgetagen wieder bis auf Normwerte ab (Abb. 3.20.).

CK-MB als Myokardmarker war bei Abstoßungsreaktionen erhöht (siehe Abb. 3.21.).

Der CK-Wert ist jedoch kein spezifisches Diagnosekriterium einer Abstoßung und muss immer im Zusammenhang mit den Anti-Schwein-Antikörper-Titern gesehen werden. Besonders bei Pavian 10 und 12 ist seine Aussagekraft durch die intramuskuläre Applikation von Tacrolimus und Sirolimus, die allein für sich schon eine CK-Erhöhung verursacht, stark eingeschränkt.

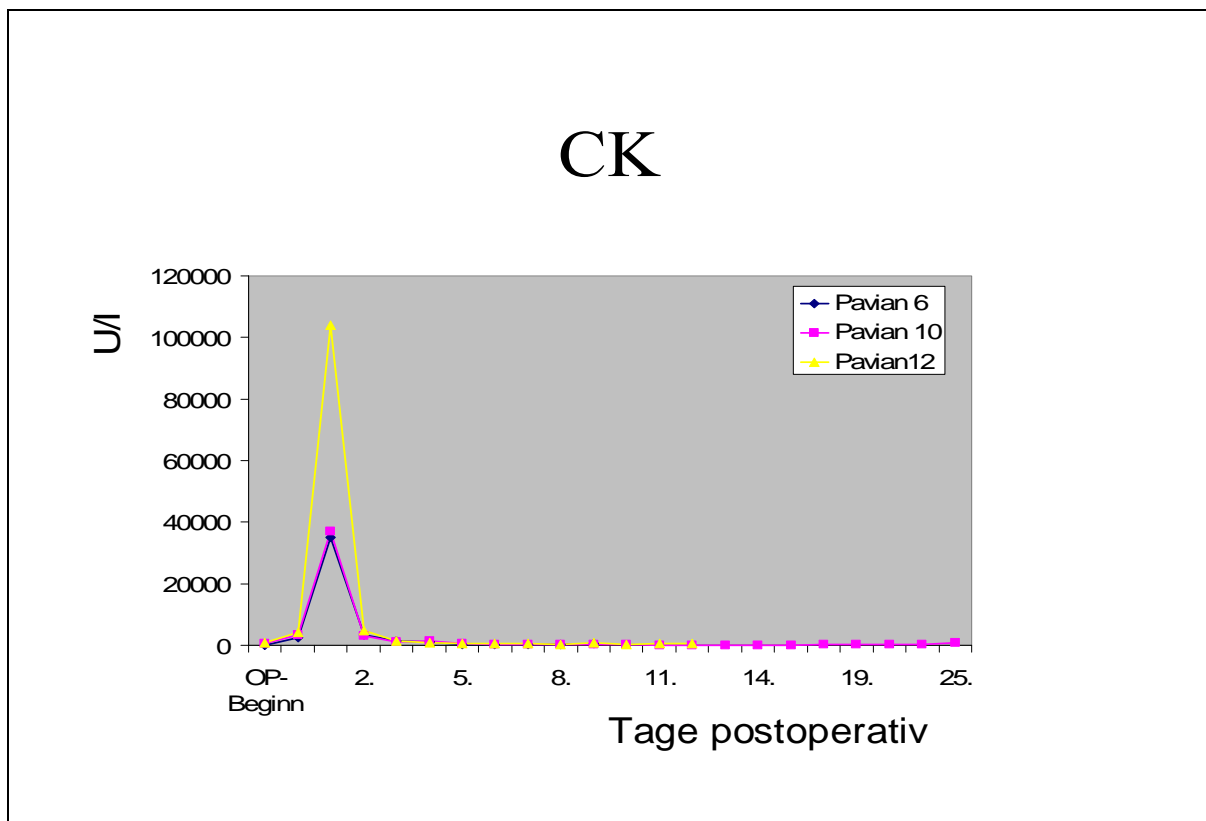


Abb. 3.20.: Anstieg der Creatinkinase durch die Operation (Ischämie-Reperfusionsschaden)

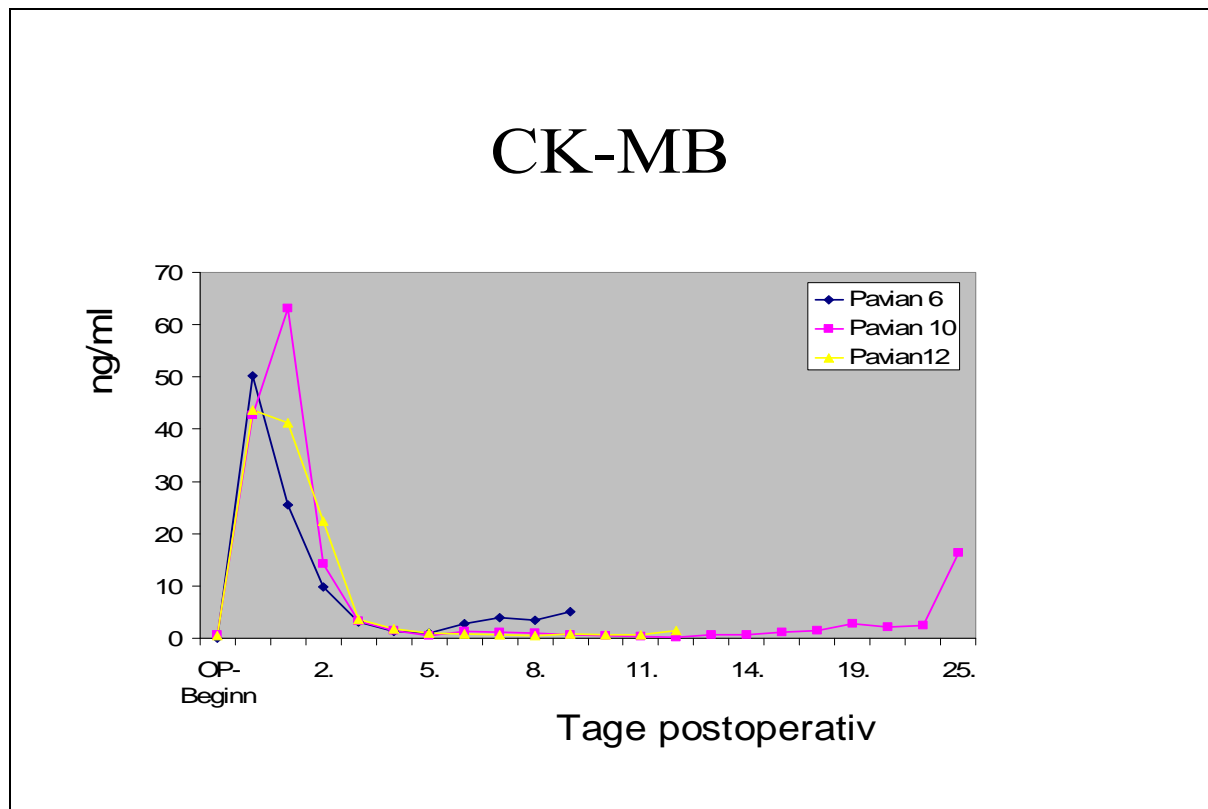


Abb. 3.21.: Anstieg der CK-MB durch Operation und Abstoßung

### 3.13. Komplement (C3, C4)

Die im Serum messbaren Komplementfaktoren C3 und C4 stiegen nach der Operation an, da durch die extrakorporale Zirkulation im Rahmen einer systemischen Inflammation Komplement aktiviert wird.

Wenn bei einer hyperakuten oder akut-vaskulären Abstoßungsreaktion Komplement an das Transplantat bindet, sinken die im Serum messbaren Spiegel ab. Dieser Prozess fand bei Pavian 6 ab dem 6. postoperativen Tag, bei Pavian 10 ab dem 12. postoperativen Tag und bei Pavian 12 ab dem 9. postoperativen Tag statt (Abb. 3.22. und 3.23.).



## Komplement (C3)

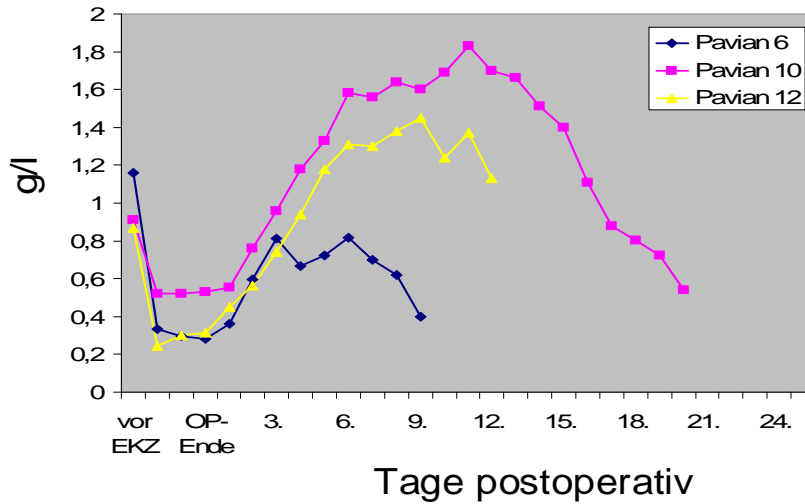


Abb. 3.22.: Verlauf des Komplementfaktors C3 im Serum

## Komplement (C4)

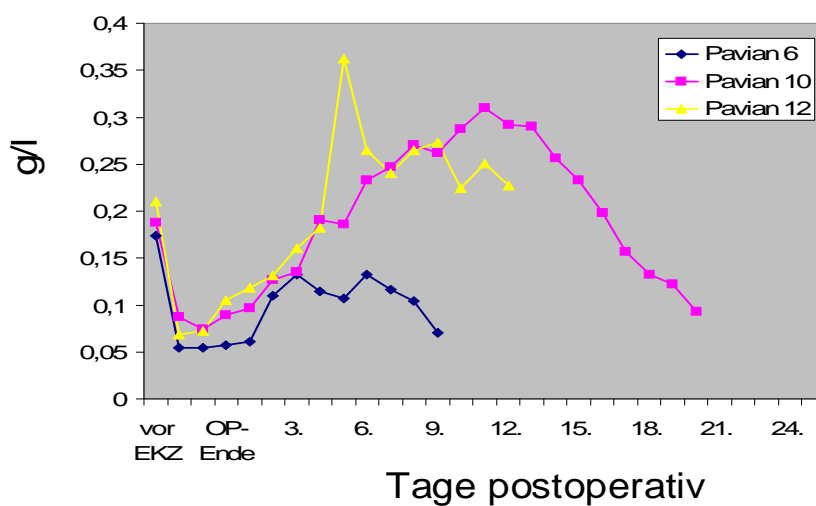


Abb. 3.23.: Verlauf des Komplementfaktors C4 im Serum

### 3.14. Zunahme des Herzgewichts

Die Zunahme des Herzgewichts war zum einen durch natürliches Wachstum bedingt, zum größeren Teil jedoch durch ödematöses Aufquellen und Hämorrhagie bei Abstoßung.

Die stärkste Zunahme von Größe und Gewicht fand sich bei Pavian 10, der nach 25 Tagen ein Herzgewicht von 128 g aufwies (Abb. 3.25.), über ein Drittel mehr als vor der Transplantation.

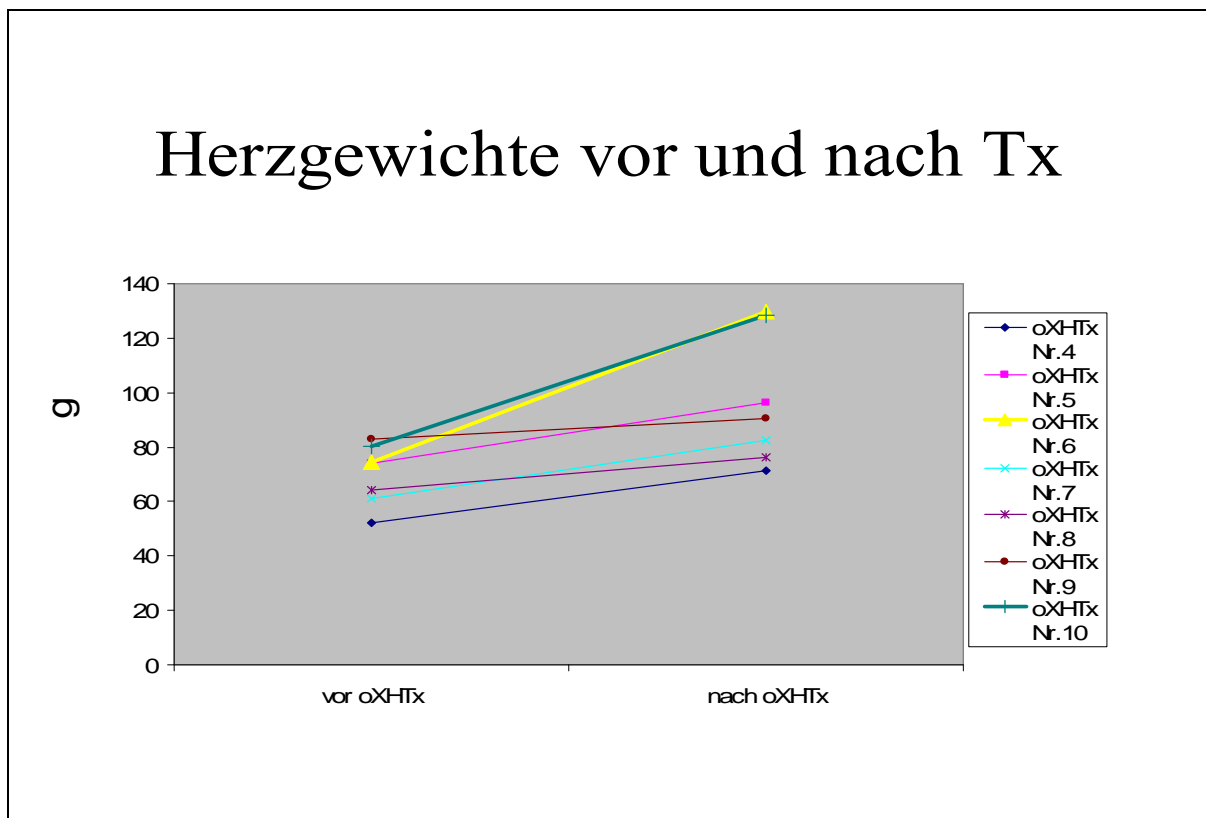


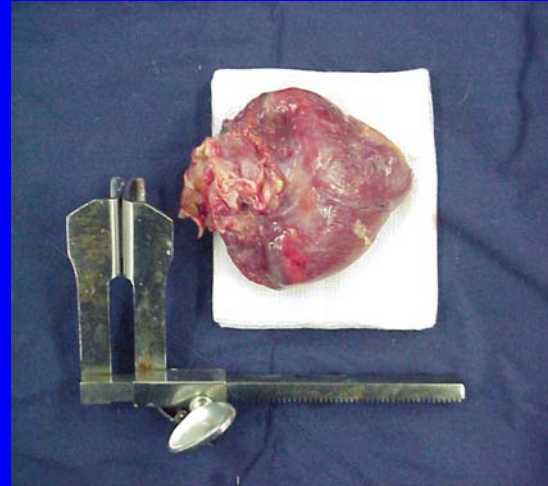
Abb. 3.24.: Zunahme des Herzgewichts

vor HTx:



80g

nach 25 Tagen:



128g

Abb. 3.25.: Zunahme des Herzgewichts

### 3.15. Pathologie, Histopathologie und Immunhistochemie

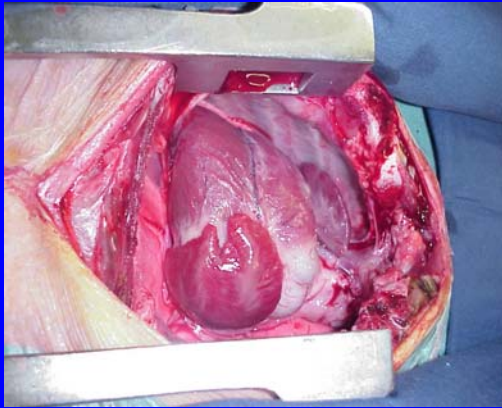
Neun (Pavian 6), 14 (Pavian 12) und 25 Tage (Pavian 10) nach orthotoper Xenoherztransplantation zeigten bei der Sektion Stauungszeichen wie Perikarderguss, Pleuraerguss, Lungenödem und Aszites (Abb. 3.27., 3.28.).

Vom äußeren Aspekt her war das Herz immer ödematös aufgequollen und fleckförmig livide verfärbt (Abb. 3.29. – 3.32.). Bei Pavian 10 kam eine chronisch granulierende Perikarditis hinzu (Abb. 3.26.).

In der histopathologischen Untersuchung zeigten sich typische Zeichen einer humoralen Abstoßungsreaktion: Immunglobulinablagerungen am Endothel, IgM deutlich mehr als IgG, Fibrin (Abb. 3.34.), Thromben (v.a. in den Venolen) und ein ödematös aufgelockertes Gewebe mit interstitiellen Hämorrhagien und Myozytennekrosen (Abb. 3.35.). Die

immunhistochemische Anfärbung mit Myeloperoxidase zeigte kein oder lediglich moderates granulozytäres Infiltrat (Abb. 3.33.).

Herz im  
Schwein vor  
HTx:



Herz im Pavian  
nach 25 Tagen:

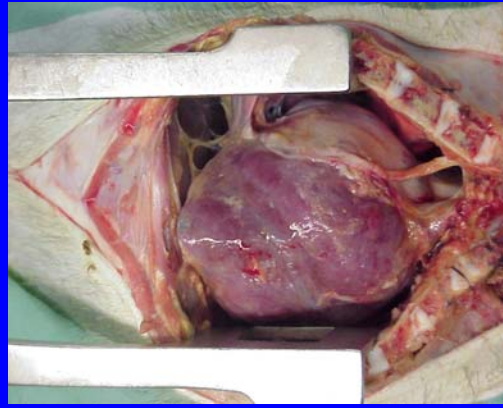


Abb. 3.26.: Das Herz von Pavian 10: links vor Transplantation noch im Schweinesitus, rechts bei Sektion 25 Tage postoperativ mit fibrinöser Perikarditis

Die Pathologiebefunde der Paviane, die nicht an einer akut-vaskulären Abstoßung verstorben sind, waren wie folgt:

Zirkulatorisch ischämische Nekrosen ohne Hinweis auf hyperakute Abstoßungsreaktion zeigten sich bei Pavian 1, Pavian 2, Pavian 3, Pavian 4, Pavian 5, Pavian 7 und Pavian 11.

Bei Pavian 8, der an einem toxischen Lungenödem verstarb, lag ein Mischbild einer zirkulatorisch ischämischen Schädigung und einer hyperakuten Abstoßung mit einzelnen Fibrinthromben vor. Auch Pavian 9 wies einzelne venuläre Thrombi auf, wobei aber auch hier die Nekrosen am ehesten zirkulatorisch ischämisch bedingt waren (Transplantatversagen).





Abb. 3.27.: Perikarderguss; Hämorrhagien an der Anastomose des rechten Vorhofes

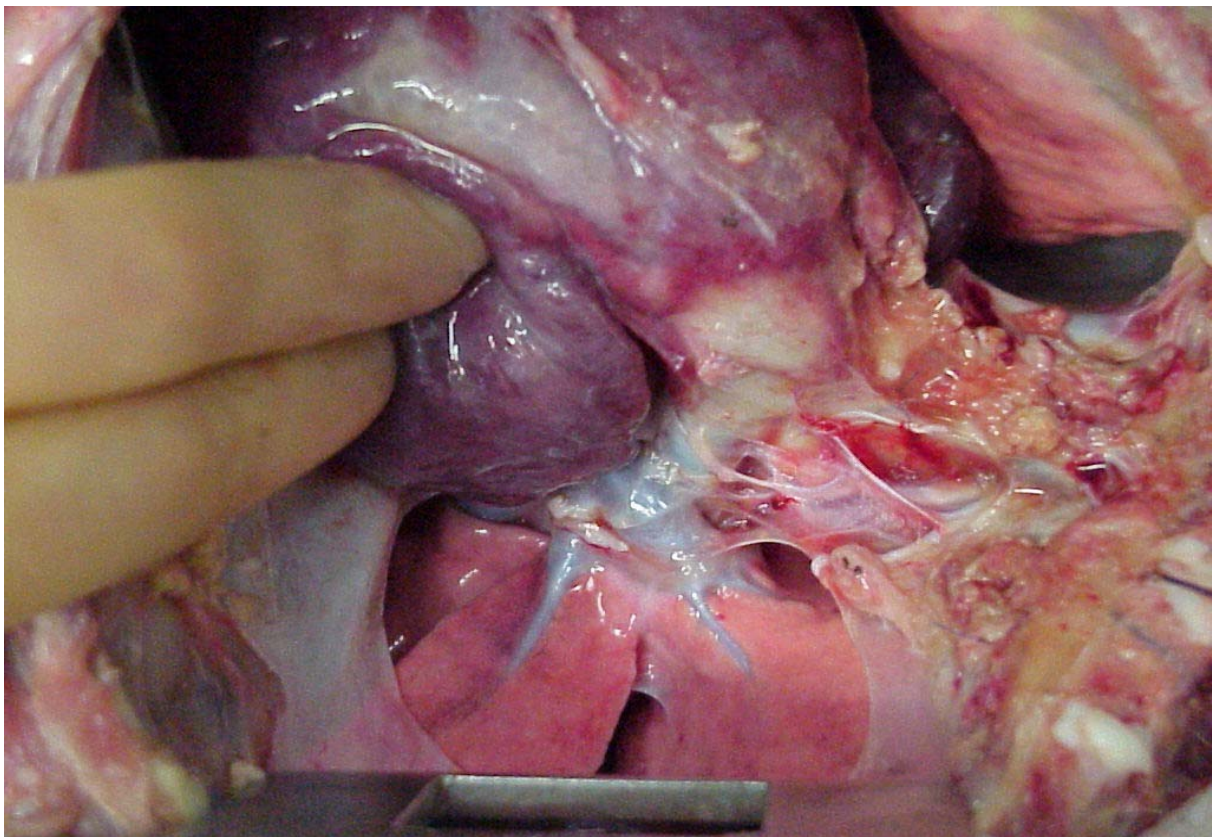


Abb. 3.28.: gestaute Lungenvenen als Zeichen des Herzversagens



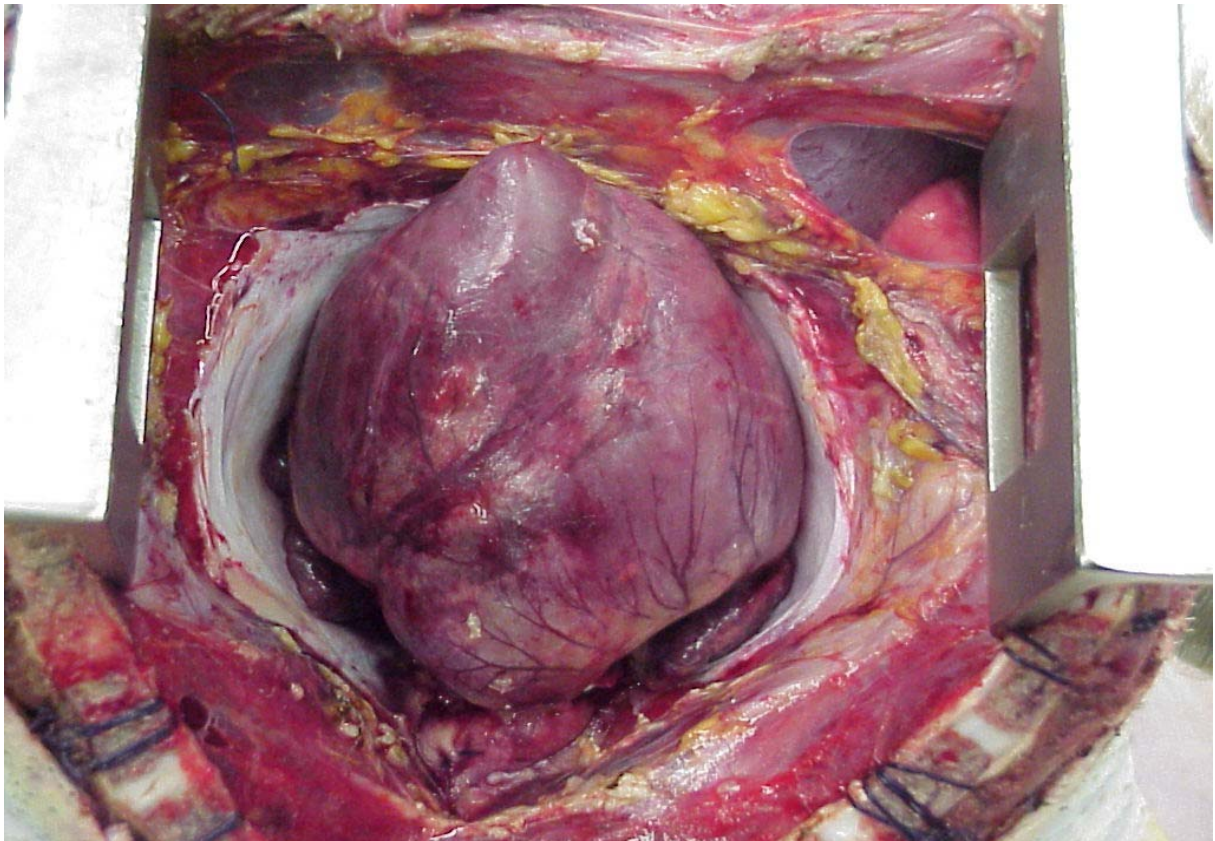


Abb. 3.29.: Ödematös aufgequollenes Herz mit fleckförmigen Hämorrhagien

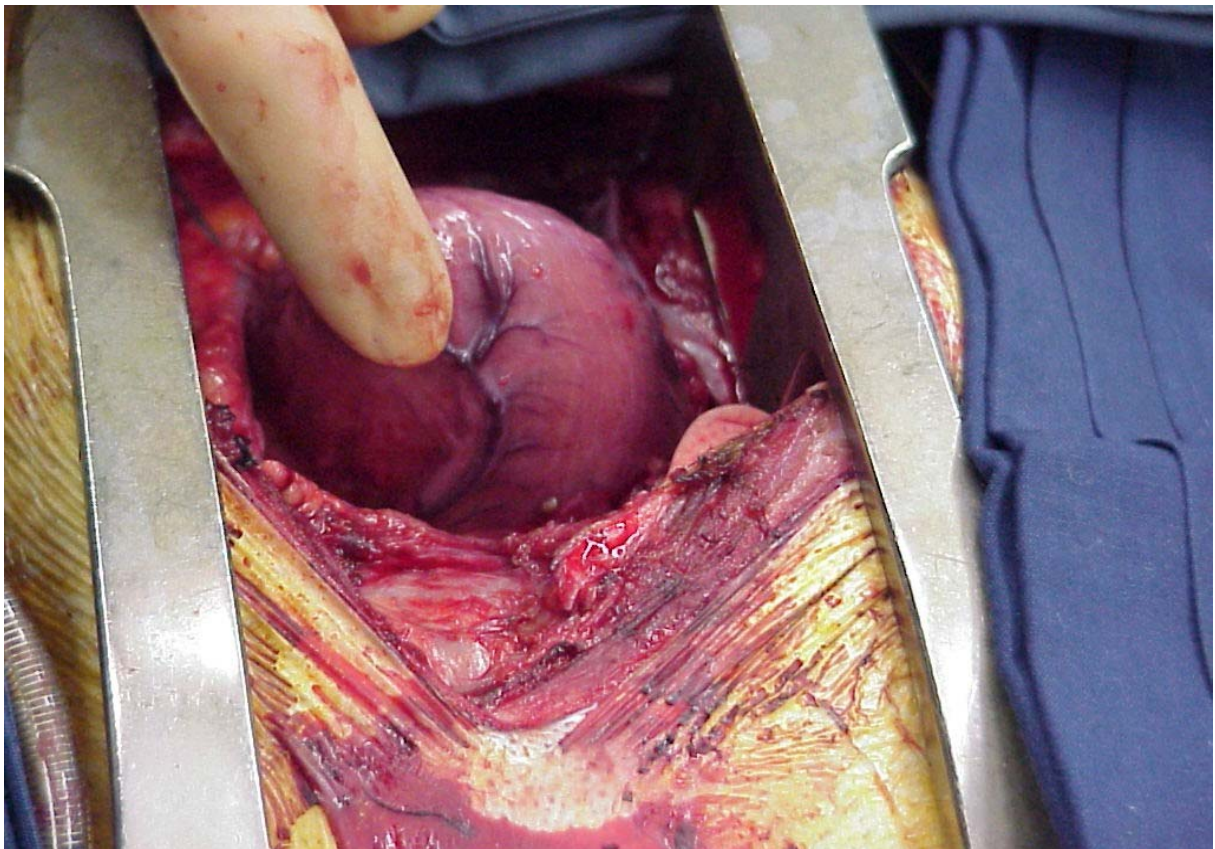


Abb. 3.30.: Durch Thrombose prominent hervorquellende V. cordis magna



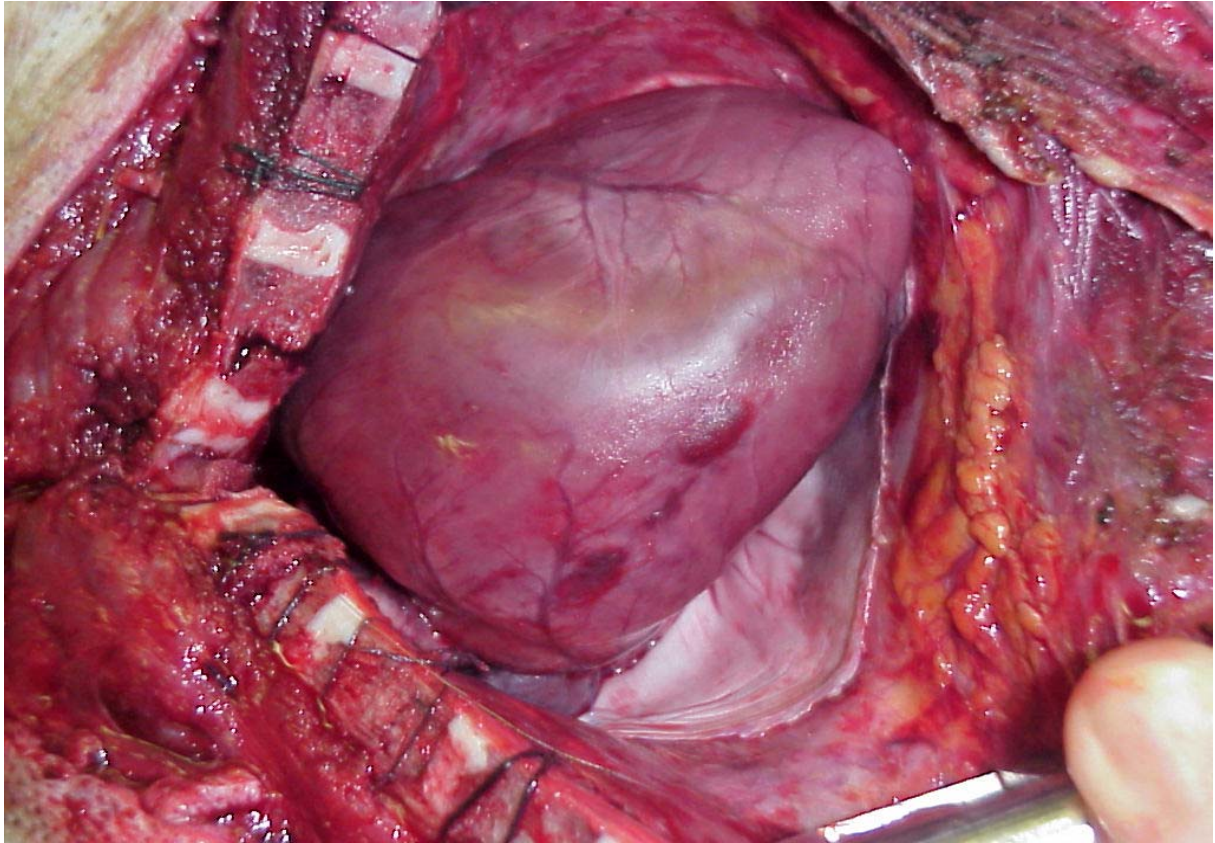


Abb. 3.31.: Fleckförmige Thromben

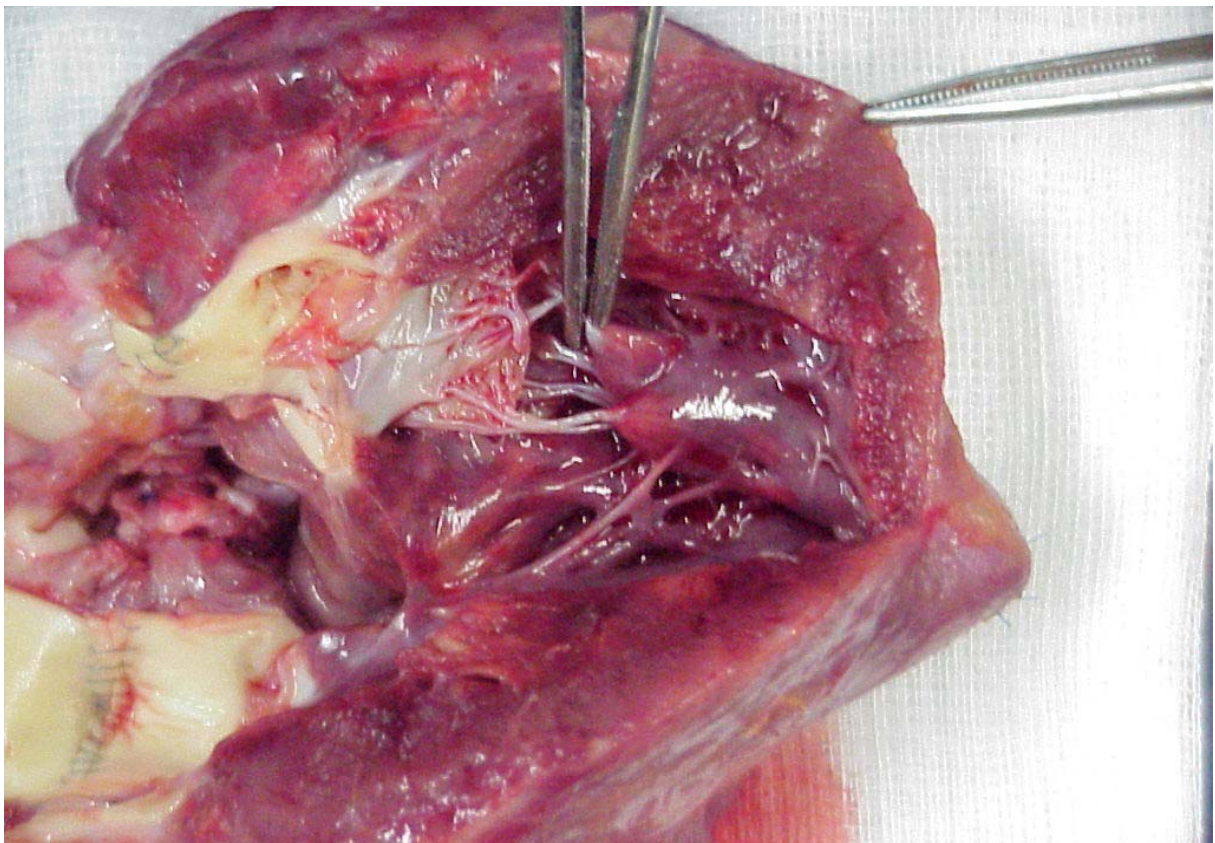


Abb. 3.32.: Der linke Ventrikel ist eröffnet; Hämorrhagien auch an den Papillarmuskeln



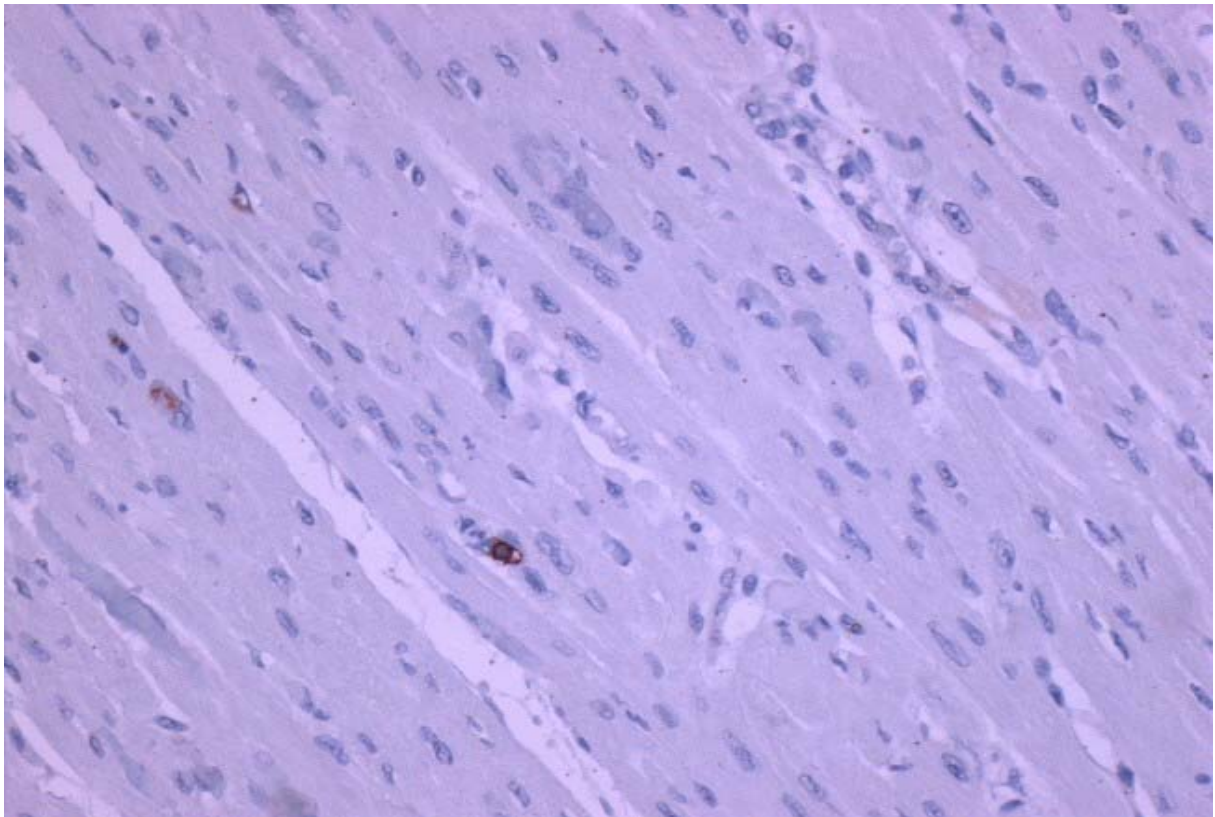


Abb. 3.33.: Pavian 10, CD 45-Färbung (20fach vergrößert): kein zelluläres Infiltrat

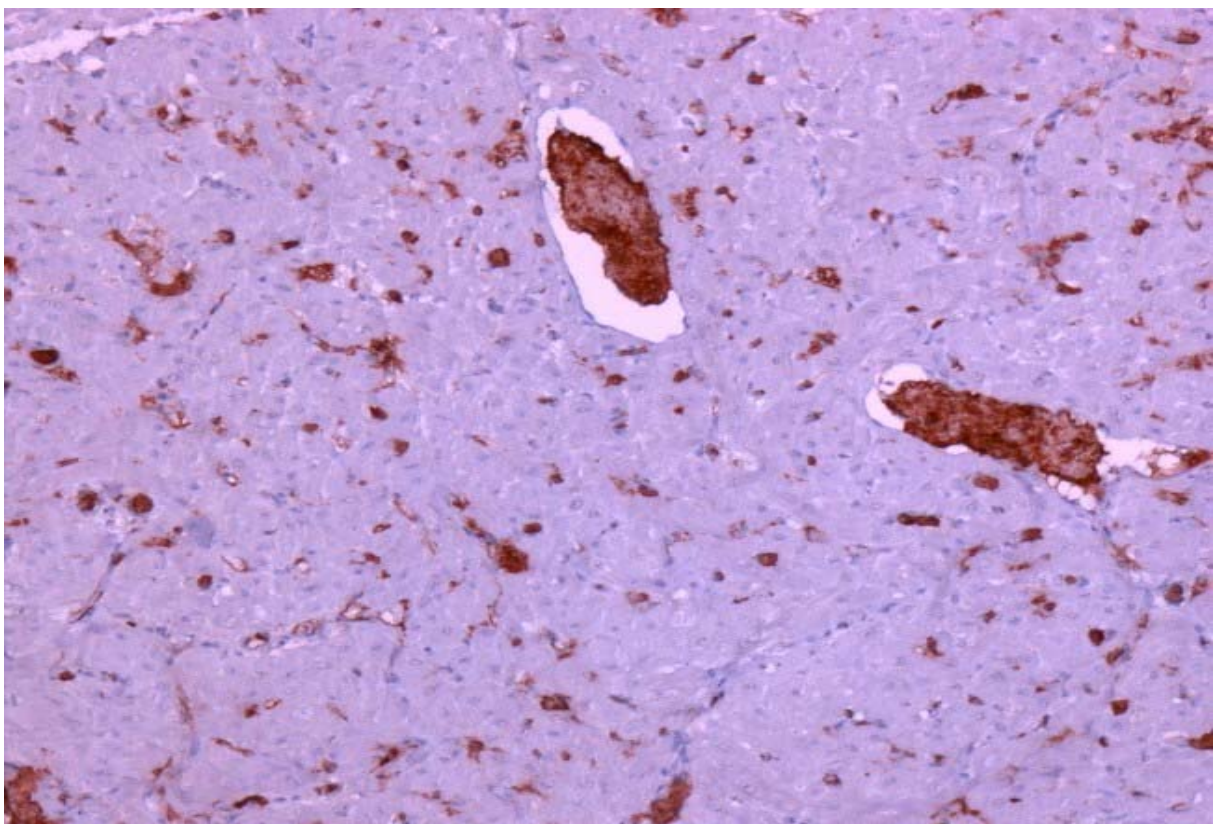


Abb. 3.34.: Pavian 10, Fibrinfärbung (10fach vergrößert): Thromben in den Venolen als typisches morphologisches Korrelat der akut vaskulären Abstoßungsreaktion



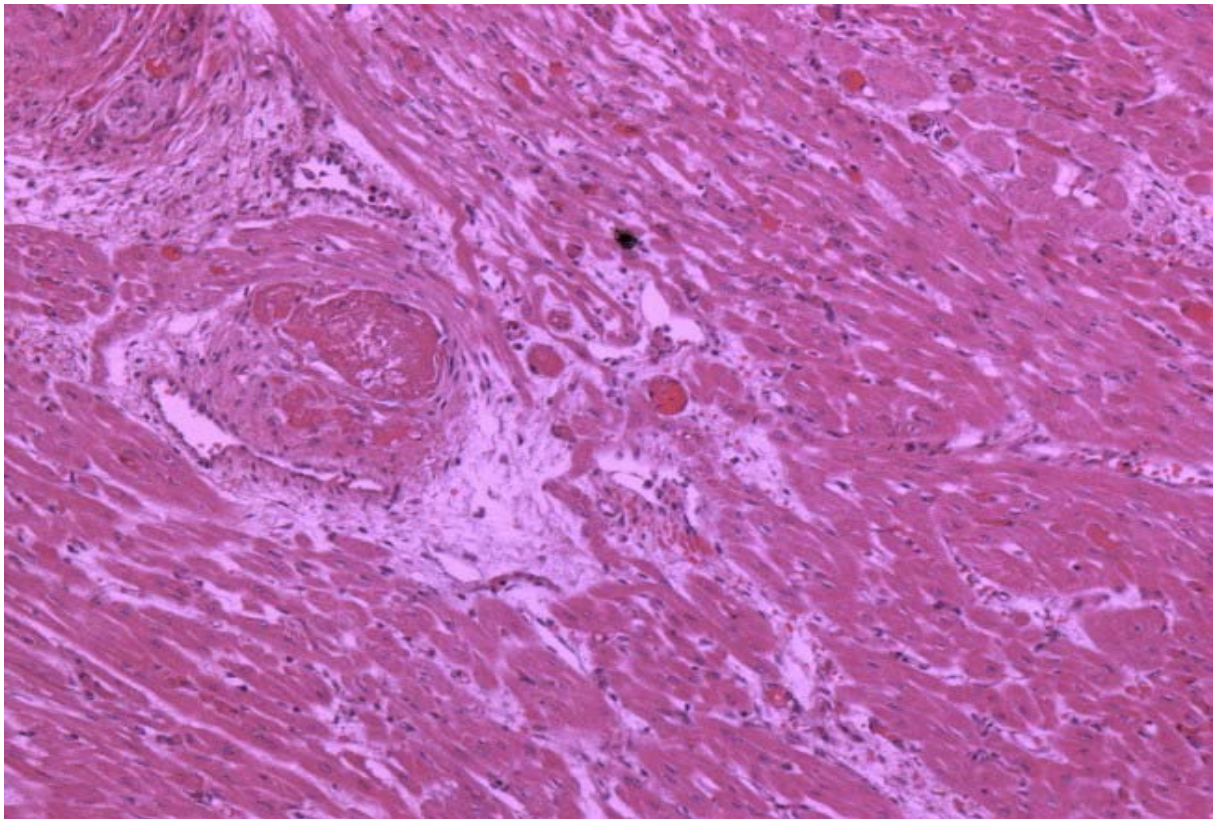


Abb. 3.35.: Pavian 10, HE (10fach vergrößert): Nekrosen, Ödeme und Hämorrhagien bei akut vaskulärer Abstoßungsreaktion am 25. postoperativen Tag

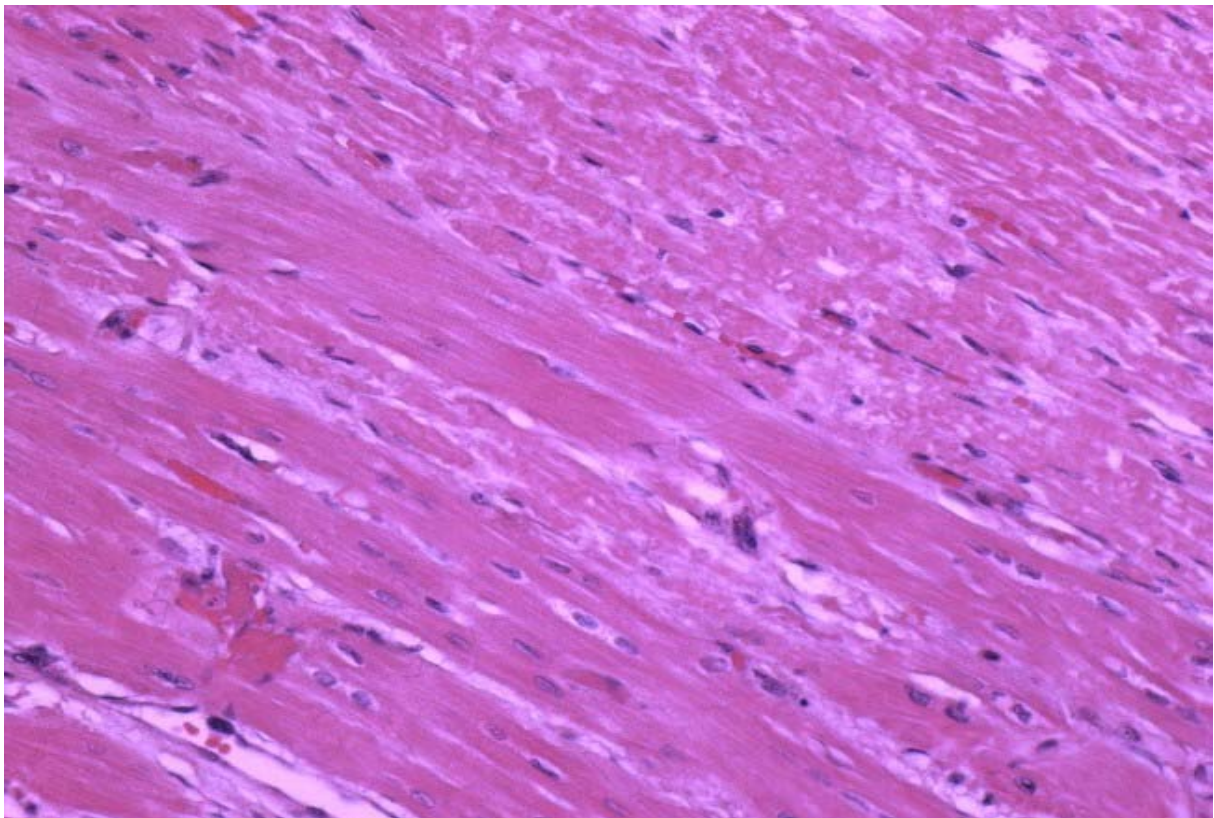


Abb. 3.36.: Pavian 10, HE (20fach vergrößert)

## **4. DISKUSSION**

### **4.1. Vor- und Nachteile der Xenotransplantation im Vergleich zur Allotransplantation und anderen Therapieformen der terminalen Herzinsuffizienz**

#### **Xenotransplantation**

Der große Vorteil der Xenotransplantation ist der unbegrenzte Pool an Spenderorganen in jeder Größe und zu jeder Zeit. Der Organhandel, wie er derzeit in China noch stattfindet (Warren 2007, Wenk 2007), würde ebenso wie der Tod auf der Warteliste, der Vergangenheit angehören. Darüber hinaus könnte die Indikation zur Herztransplantation früher und öfter gestellt werden, wodurch sowohl die Ergebnisse nach Transplantation als auch das Überleben bei terminaler Herzinsuffizienz insgesamt verbessert würden, da nicht mehr nur wenige Schwerstkranke ein Organ bekämen. Die Xenotransplantation könnte, wie die Allotransplantation, eine definitive Therapie der Herzinsuffizienz darstellen.

Die Explantation und Implantation der Organe könnten in derselben Klinik durchgeführt werden, was die Ischämiezeit drastisch verkürzen würde. Da eine Ischämiezeit von mehr als vier Stunden mit einer signifikant erhöhten Mortalitätsrate vergesellschaftet ist (Hakim 1993), wäre dies ein eindeutiger Vorteil der Xenotransplantation gegenüber der Allotransplantation.

Das Spenderschwein hätte keine Vorerkrankungen und keinen Hirntod erlitten, d.h. es würde sich um gesunde Organspender handeln. Ganz im Gegenteil zur Allotransplantation, bei der der hirntote Spender häufig längere Zeit beatmet war oder kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Nikotinabusus und Bluthochdruck aufweist.

Darüber hinaus bestünde eine ideale Planbarkeit der Operation mit der Möglichkeit der präoperativen Immunsuppression des Empfängers und einem genauen Screening des Spenderschweins auf pathogene Keime.

Obwohl Schweine- und Menschenherzen sowohl anatomisch als auch physiologisch sehr ähnlich sind (Ibrahim 2006), gibt es doch einige Unterschiede (siehe Kap. 1.3.), die eine

diskordante Xenotransplantation im Vergleich zu einer Allotransplantation erschweren (Hammer 1997).

Einen entscheidenden Nachteil, der eine klinische Anwendung der xenogenen Herztransplantation derzeit verbietet, stellt neben der Überwindbarkeit der Abstoßungsreaktionen, die mit erheblichen Nebenwirkungen behaftete notwendige starke Immunsuppression dar. Durch sie hervorgerufene schwere Infektionen und Malignome, sowie die Übertragung für den Menschen pathogener porciner Erreger (vor allem porciner endogener Retroviren, siehe auch Kap. 4.5.) sind mit einem hohen Risiko für den Patienten und sein Umfeld vergesellschaftet.

Die Kosten einer Xenotransplantation wären wegen den Entwicklungskosten zumindest initial höher als die einer Allotransplantation (Brenner 2003, Kap. 4.7.).

Die ersten klinischen Xenotransplantationen, sind höchstwahrscheinlich Inselzelltransplantationen (Hering 2006), da Inselzellen kein Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Epitop aufweisen. Von den soliden Organen werden die ersten Eingriffe am Menschen vermutlich Nierentransplantationen sein, da es sich hierbei um Operationen handelt, deren Scheitern der Patient aufgrund der Möglichkeit einer Dialyse trotzdem überleben würde. Eine xenogene Herztransplantation wird wohl zunächst nur als bridge-to-transplant-Therapie in aussichtsloser Situation eingesetzt werden, bevor sich das Verfahren soweit etabliert hat, dass auch größere klinische Studien durchgeführt werden können. Ob die langfristigen Ergebnisse jemals so gut wie bei der Allotransplantation werden, ist derzeit spekulativ.

### **Allotransplantation:**

Die Allotransplantation ist derzeit Goldstandard in der Therapie der terminalen Herzinsuffizienz. Sie ist mit einer 1-Jahresüberlebensrate von 80-90% und einer 5-Jahres-Überlebensrate von 70-80% allen anderen Therapieformen deutlich überlegen. Die große Mehrheit der Transplantierten hat keine Beschwerden bei Alltagsbelastungen (NYHA I).

Der Nachteil der Herztransplantation im Vergleich zur medikamentösen Therapie oder Kunstherzen ist die lebenslang notwendige Immunsuppression mit dem Risiko für Infektionen und die Entwicklung von Malignomen.

### **Mechanische Herz- und Kreislaufunterstützungssysteme (Assist devices) und Kunstherz**

Man unterscheidet linksventrikuläre (z.B. Novacor<sup>®</sup>, World Heart, Oakland, CA, USA), rechtsventrikuläre (Berlin-Heart<sup>®</sup>, Berlin-Heart GmbH, Berlin, Deutschland) und biventrikuläre (Berlin-Heart<sup>®</sup> oder Thoratec<sup>®</sup>, Thoratec Corporation, Pleasanton, CA, USA) Herzunterstützungssysteme. Ihr klinischer Einsatz als kurzfristige Überbrückung bis zur Herztransplantation (bridge-to-transplant) bzw. bis zur Erholung eines akuten Herzversagens bei Myokarditis o.ä. (bridge-to-recovery) ist in spezialisierten Zentren mittlerweile Routine (Hunt 1998). Als endgültige Therapie (sog. destination therapy) der terminalen Herzinsuffizienz sind sie mit einer 1-Jahresüberlebensrate von 50% der Herztransplantation deutlich unterlegen (Rose 2001). Assist devices haben mehrere Nachteile: erstens ist eine strenge Antikoagulation erforderlich, die nicht selten zu thrombembolischen oder Blutungskomplikationen führt. Besonders perioperativ müssen die Patienten häufig massentransfundiert werden, wodurch die Antikörperproduktion angekurbelt wird. Dies führt dann bei der bridge-to-transplant-Therapie zu erhöhter Abstoßungsinzidenz des Organs. Zweitens besteht durch die Kabelverbindung des devices mit der Batterie außerhalb des Körpers eine Erregereintrittspforte, die selbst bei hervorragender Hygiene zu Infektionen prädisponiert. Die Lebensqualität im Alltag ist erheblich beeinträchtigt (Griffith 1989).

Nicht zuletzt sind die Anschaffungs- und Einsatzkosten eines Assist devices enorm hoch.

Trotzdem werden Herzunterstützungssysteme mittelfristig neben der Xenotransplantation den Organmangel am ehesten beheben können.

### **Plastische Operationen zur Verkleinerung des linken Ventrikels**

Einer ischämischen Kardiomyopathie geht in der Regel ein Myokardinfarkt voraus, der eine Narbe hinterlässt. Im Bereich dieser Narbe kann ein Aneurysma entstehen, welches zu einer Dilatation des Ventrikels führen kann. Die Auswurfraction kann in so einem Fall erhöht werden, indem man eine Aneurysmektomie nach DOR durchführt. Dieser Eingriff ist jedoch mit einem hohen Risiko verbunden (7,2% Mortalität; Mencinatti 2002) und kann eine notwendige Herztransplantation oft nur hinauszögern.

Kardiomyoplastien mit Skelettmuskel oder Netzumkleidung des Herzens befinden sich noch in der Testphase bzw. wurden von einigen Zentren aufgrund mangelnden Erfolges bereits früh verlassen.

### **Bypassoperation / Perkutane transluminale Coronarangioplastie (PTCA)**

Bei terminaler Herzinsuffizienz aufgrund einer ischämischen Kardiomyopathie muss grundsätzlich geklärt werden, ob durch eine Bypassoperation oder eine interventionelle Koronarrevaskularisation mittels PTCA und Stentimplantation eine Verbesserung der Pumpfunktion erreicht werden kann. Dies geschieht mit Hilfe der Myokardszintigraphie oder der Positronen-Emissions-Tomographie (PET), durch welche ermittelt werden kann, ob es sich bei dem zu revaskularisierenden Areal noch um vitales aber akinetisches Myokard (sog. hibernating myocardium) oder um eine Narbe handelt.

### **Konservative Therapie der Herzinsuffizienz**

Die konservative Therapie der Herzinsuffizienz besteht zunächst aus Allgemeinmaßnahmen wie Gewichtsreduktion, Nikotin- und Alkoholverzicht, kochsalzarme Diät und Trinkmengenbeschränkung. Pharmakologisch indiziert sind Medikamente, die die Vor- und Nachlast senken (z.B. ACE-Hemmer, Diuretika, Aldosteron-Antagonisten und Betablocker).

Dadurch werden die Wandspannung des Myokards und damit der myokardiale Sauerstoffverbrauch reduziert.

Bei Vorhofflimmern – und damit fehlender Vorhofkontraktion - kann der Versuch einer Kardioversion (entweder elektrisch oder mit Antiarrhythmika wie Sotalex oder Amiodaron) unternommen werden, die aber häufig wegen der dilatierten Herzhöhlen nicht gelingt. In diesem Fall beschränkt man sich auf Frequenzkontrolle (z.B. mit Digitalis) und Antikoagulation (Marcumar), die ab einer Auswurfraction von weniger als 25% ohnehin indiziert ist. Eine symptomatische Verbesserung bei Linksschenkelblock kann durch die Resynchronisationstherapie mittels eines biventrikulären Schrittmachers erreicht werden. Bei ventrikulären Rhythmusstörungen ist eine Langzeittherapie mit Amiodaron bzw. die Implantation eines Defibrillators (ICD) erforderlich.

Die 5-Jahresüberlebensrate der chronischen Herzinsuffizienz beträgt bei konservativer Therapie im Stadium NYHA III (= Dyspnoe bei leichter Belastung) 40%, im Stadium NYHA IV (= Ruhedyspnoe) 20%. Dies entspricht einem deutlich schlechteren Ergebnis als nach einer Herztransplantation.

Der Vorteil der konservativen Therapie ist die fehlende Notwendigkeit einer Immunsuppression. Häufige Krankenhausaufenthalte durch Dekompensation und das schlechte Langzeitergebnis trotz hoher Kosten (Medikamente, differenzierte Schrittmacher- und Defibrillatorsysteme) machen sie jedoch nicht zur Therapie der Wahl bei terminaler Herzinsuffizienz.

### **Stammzelltherapie**

Skelett-Myoblasten wurden zur Reparatur fokaler Myokardschäden im Tiermodell (Taylor 1998) und am Menschen (Menasche 2001) getestet. Es ist noch nicht geklärt, ob Myoblasten funktionierende Kardiomyozyten ersetzen können.

Mit mesenchymalen Stammzellen versucht man, ischämisches Myokard zu revaskularisieren (Itescu 2002).

Zahlreiche Fragen sind derzeit noch offen: Welche Zellen sollte man injizieren: Skelettmyoblasten, endotheliale Vorläuferzellen, embryonale Stammzellen oder adulte mesenchymale Stammzellen? Wann ist der beste Zeitpunkt für die Applikation von Stammzellen: im akuten Infarkt, während der Phase des ``remodelings`` oder in der Endphase der ischämischen Kardiomyopathie? Wohin sollen die Stammzellen injiziert werden: intramyokardial, intrakoronar oder systemisch? Eine nicht einschätzbare Gefahr stellt außerdem die Arrhythmogenität der Stammzellen und ihre mögliche Differenzierung in Fibroblasten oder Tumorzellen dar (Lee 2004).

Diese Art der Therapie befindet sich derzeit noch im experimentellen Stadium. Sie hat aber, falls sie erfolgreich umgesetzt wird, das Potential, den Bedarf an Herztransplantationen zu senken oder zumindest in ein höheres Alter des Patienten zu verschieben.

### **Tissue Engineering**

Ein Problem der Zelltransplantation ist die Ausrichtung der Zellen für optimale Funktion im Zellverband. Hier setzen Strategien des Tissue Engineerings an, wo synthetische oder biologische Polymere eingesetzt werden, um das Wachstum und die Ausrichtung der Zellen im Gewebe zu unterstützen. Bisher können z.B. Blutgefäße (Niklason 1999), Herzklappen (Shinoka 1995) und Herzmuskelgewebe (Leor 2000), nicht jedoch ein ganzes Organ so hergestellt werden. Maßgeblich beteiligt am Fortschritt des Tissue Engineerings ist die Plastische Chirurgie, wo die tägliche Konfrontation mit chronischen, nicht heilenden Wunden oder Verbrennungen zur erfolgreichen Entwicklung eines Hautersatzgewebes basierend auf einer Keratinozyten-Fibrinkleber-Suspension mit azellulärer Dermis geführt hat (Horch 2001).

Die Züchtung eines gesamten, funktionstüchtigen Herzens liegt jedoch noch in ferner Zukunft. Probleme hierbei sind, dass die gezüchteten Gewebe zu klein sind und nicht ausreichend vaskularisiert werden.

## **4.2. Orthotope Xeno-Herztransplantation als präklinisches Modell**

Unter *orthotoper* Herztransplantation versteht man die Implantation des Herzens an die Stelle, wo sich das ursprüngliche, erkrankte Herz befand. Unter *heterotoper* Herztransplantation versteht man im (klinischen) Allotransplantationsmodell die Implantation des Herzens in den Thoraxraum unter Belassung des alten Herzens. Anastomosiert werden beide Aortae und Aa. pulmonales. Indiziert ist diese heute nur noch sehr selten durchgeführte Operation bei pulmonalem Hypertonus, wenn man auf eine kombinierte Herz-Lungen-Transplantation verzichten möchte. Im Xenotransplantationsmodell versteht man unter *heterotoper* Herztransplantation die Implantation des Herzens in das Abdomen unter Anastomosierung von Spenderaorta mit Aorta abdominalis des Empfängers und Spenderpulmonalis mit Vena cava inferior des Empfängers. Es handelt sich um den weitaus kleineren operativen Eingriff, da keine Herz-Lungen-Maschine und damit keine Vollheparinisierung erforderlich sind, wodurch die Nachblutungsgefahr reduziert ist. Aufgrund der Tatsache, dass das Transplantat hier keine sog. "life-supporting"-Funktion übernimmt, d.h. das Tier bei Transplantatdysfunktion oder -versagen nicht sofort stirbt, ist das *heterotope* Modell grundsätzlich besser geeignet, um immunologische Vorgänge über einen längeren Zeitraum studieren zu können.

Im *orthotopen* Schwein-Pavian-Modell bedeutet bereits ein einmalig auftretendes Kammerflimmern in der postoperativen Phase das Ende des Versuchs, während in der Klinik auf einer modernen Intensivstation diese Rhythmusstörung in der Regel durch schnelle Defibrillation terminiert werden kann. Genauso verhält es sich mit vielen anderen häufigen Komplikationen, wie z.B. Nachblutungen und Infektionen, deren erfolgreiche Diagnose und



Therapie eine engmaschige Intensivüberwachung mit Kreislaufmonitoring, Blutgasanalysen und sonstigen Blutabnahmen in kurzen Intervallen zur Voraussetzung haben. All dies ist bei einem gefährlichen Tier wie dem Pavian nicht möglich. Jede Blutabnahme erfordert aus Sicherheitsgründen eine Sedierung, welche in der Summe das Tier deutlich schwächen. Nach der Extubation noch auf dem OP-Tisch lebt der Pavian sofort unter „Normalstationsbedingungen“, da im Käfig keine adäquate Herz- / Kreislaufüberwachung möglich ist. Die Phase der Intensivstation mit Katecholamin- und Volumentherapie entfällt komplett. Die *orthotope* Xeno-Herztransplantation ist jedoch das einzige Modell, welches als „präklinisch“ bezeichnet werden darf. Nur hier haben lange Überlebenszeiten wirklich eine Aussagekraft. Wenn der Pavian lebt, bedeutet dies, dass das Spenderherz ein ausreichendes Schlagvolumen generiert. Im *heterotopen* Modell wird ein Versuch meist als beendet angesehen, sobald das Herz im Abdomen aufgehört hat zu schlagen. Der Zeitpunkt, zu dem es nicht mehr in der Lage wäre, einen ausreichenden systemischen Blutdruck aufrechtzuerhalten, wird nicht erfasst und liegt meistens deutlich früher.

Unsere Arbeitsgruppe führt sowohl *orthotope* als auch *heterotope* Transplantationen mit unterschiedlichen Fragestellungen durch. In der hier beschriebenen Serie ging es darum, ein möglichst langes Überleben zu erreichen, was mit dem *orthotopen* Modell zwar schwieriger, aber aussagekräftiger ist.

## **4.3. Immunologie**

### **4.3.1. Bedeutung von GAS 914 und des Human Decay Accelerating Factors (hDAF) bei der Unterdrückung der hyperakuten Abstoßung**

Die tägliche Applikation von GAS 914, einem löslichen Typ II Gal $\alpha$ (1,3)Gal Trisaccharid, führte zu einer sofortigen und dauerhaften signifikanten Reduktion der präformierten anti-Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper. Diese Reduktion war unabhängig von den individuell extrem variablen Ausgangstitern der Paviane (s.a. Kap. 3.3.). IgG und IgM wurden gleichermaßen

gebunden. Da bis zu 90% der präformierten Antikörper Gal $\alpha$ (1,3)Gal-spezifisch sind (Buonomano 1999, Diaz 2003), kann GAS 914 die hyperakute Abstoßungsreaktion in Kombination mit einem Komplementregulator sicher und zuverlässig verhindern. Die akut-vaskuläre Abstoßung kann nur in ihrer Anfangsphase durch GAS 914 unterdrückt werden, solange die induzierten Antikörper Gal $\alpha$ (1,3)Gal-spezifisch sind. Sobald B-Zell-Klone herangereift sind, die non-Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper produzieren, reicht die Therapie mit GAS 914 nicht mehr aus (Galili 2001).

Die subkutane Applikation (Pavian 10 und 12) war (zumindest bei höherer Dosierung) genauso effektiv wie die intravenöse (Pavian 6). Sie hat den Vorteil, dass weder eine Sedierung des Tieres erforderlich ist, noch ein venöser Zugang, der eine potentielle Infektionsgefahr darstellt.

Im Gegensatz zu den Studien von Lam et al. bzw. Ghanekar et al., in denen GAS 914 bereits fünf bzw. siebzehn Tage vor Transplantation verabreicht wurde (Lam 2004, Ghanekar 2001), reichte bei uns eine Gabe am OP-Tag aus, um die anti-Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper-Titer fast auf null zu reduzieren.

Die Reduzierung der Ausgangstiter war unabhängig von der Dosis von GAS 914 (1 mg/kg i.v. bei Pavian 6 vs. 3 mg/kg s.c. bei Pavian 10 und 12).

GAS 914 zeigte keinerlei Nebenwirkungen. Es wird in der Leber metabolisiert und über die Niere ausgeschieden. Eine Immunkomplexnephritis trat nicht auf.

Die Verwendung von GAS 914 zusätzlich zu hDAF ist sinnvoll, da so zwei Mechanismen der hyperakuten Abstoßung unterdrückt werden. Dies zeigte sich auch in unserem ex vivo-Perfusionsmodell, in dem das Überleben und die hämodynamische Funktion von hDAF-Herzen durch die zusätzliche Applikation von GAS 914 deutlich verbessert werden konnte (Brandl 2007).

Auch die Arbeitsgruppe um McGregor verwendet zur Vermeidung der HAR die Kombination eines humanen Komplementregulators (hCD46) mit einem  $\alpha$ -Gal-Polyethylenglykol-Konjugat

(TPC) bei heterotopen (non-life-supporting) Herztransplantationen im Schwein-auf-Pavian-Modell und erzielt damit Überlebensraten von drei Monaten im Median (McGregor 2005).

Die Immunadsorption stellt ein effektives Verfahren zur Entfernung von Antikörpern dar (Brenner 2000). Man unterscheidet die selektive (nur anti-Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper) von der nicht-selektiven (alle Immunglobuline) Immunadsorption. Sie hat jedoch zahlreiche Nachteile und Nebenwirkungen, so dass sie zur Entfernung von Gal-Antikörpern heute nicht mehr eingesetzt wird. Es handelt sich um eine aufwendige und invasive Methode, die eine Sedierung des Versuchstieres zur Voraussetzung hat. Der Effekt ist nur von kurzer Dauer, da die Immunglobuline wieder neu synthetisiert werden. Zudem besteht Infektionsgefahr, da es sich um ein extrakorporales Verfahren handelt. Eine häufige Nebenwirkung stellt außerdem die hämolysebedingte Anämie dar (Brenner 2003).

Seit jüngster Zeit stehen Gal-knock-out-Schweine zur Verfügung (Tseng 2005), wobei auch sie in ganz geringen Mengen Gal exprimieren (Sharma 2003), und vermutlich die zusätzliche Gabe von GAS 914 auch hier sinnvoll ist (Sandrin 2007). Da auch bei diesen Herzen nach Xenotransplantation in der immunhistologischen Untersuchung Komplementablagerungen am Endothel zu finden sind (Tseng 2005), ist die zusätzliche Einbringung eines Transgens für einen Komplementregulator erforderlich.

Mittlerweile gibt es auch transgene Schweine, die mehrere humane Komplementregulatoren auf ihrem Endothel tragen (Zhou 2005), wobei die Expression von hDAF und hCD46 in Kombination im heterotopen Schwein-Pavian-Modell keine Verbesserung des Überlebens bewirkte (Manez 2004).

Die systemische Komplementinhibition mit Cobra Venom Faktor (Kobayashi 1997) oder löslichem Komplementrezeptor Typ 1 (sCR1; Pruitt 1994) ist der Expression von humanen Komplementregulatoren auf dem Endothel deutlich unterlegen. Die Infektanfälligkeit ist sehr groß, und es besteht die Notwendigkeit der ständigen Reinfusion, da die Komplementfaktoren wieder neu synthetisiert werden.

#### **4.3.2. Bedeutung von Cyclophosphamid und Rituximab bei der Unterdrückung der akut-vaskulären Abstoßung**

Cyclophosphamid hemmt als Zytostatikum sowohl B- als auch T-Lymphozyten. Die Arbeitsgruppe um David White verwendete CyP-Dosen von bis zu 40 mg/kg in Kombination mit Cyclosporin A und Steroiden bei der Transplantation hDAF-transgener Schweineherzen bzw. Schweinenieren (Schmoeckel 1998, Zaidi 1998). Obwohl die AVR nicht vermieden werden konnte, war die Transplantatfunktion bis zu mehreren Wochen signifikant verlängert. Ein Pavian überlebte sogar 39 Tage mit einem Schweineherzen in orthotoper Position (Schmoeckel 1998). Mit diesen hohen Cyclophosphamiddosen waren aber auch die Nebenwirkungen (Panzytopenie, Infektion) so ausgeprägt, dass sie den limitierenden Faktor einer längeren Überlebensdauer darstellten. Wir versuchten daher zunächst unter vollständigem Verzicht auf Cyclophosphamid ein verlängertes Überleben im orthotopen Schwein-Pavian-Modell zu erreichen, was jedoch nicht gelang. Pavian 6 verstarb am 9. postoperativen Tag an einer akut vaskulären Abstoßung. Der Kompromiss war die Halbierung der üblichen Cyclophosphamiddosis auf 20 mg/kg am Tag -1 und jeweils 10 mg/kg am Tag der Operation sowie am 1. und 2. postoperativen Tag. Die Basisimmunsuppression bestand aus GAS 914, Tacrolimus, Sirolimus, ATG und Steroiden. Mit diesem Schema gelang es uns, die AVR deutlich hinauszuzögern. Pavian 10 starb am 25. postoperativen Tag. Bis dahin lebte er in gutem Allgemeinzustand, aktiv und ohne Zeichen einer Infektion oder eines Malignoms. Er litt während der postoperativen Phase an einer medikamenteninduzierten Anämie (Cyclophosphamid, Sirolimus und ATG), die auch mit Eisenpräparaten und Erythropoietin nur schwer in den Griff zu kriegen war (s.a. Abb. 3.16.). Zu diesem Zeitpunkt standen uns leider keine Pavianfremdblutkonserven zur Verfügung.

In der histopathologischen Untersuchung (s.a. Kap. 3.16.) zeigte sich eine humorale Abstoßung mit Immunglobulin- und Komplementablagerungen am Endothel, interstitiellen Hämorrhagien, wenig granulozytärem Infiltrat und ausgeprägte Fibrinablagerungen und

Thromben. Dieses Bild der sog. thrombotischen Mikroangiopathie beschreiben auch andere Arbeitsgruppen (McGregor 2005, Tseng 2005), die im heterotopen Modell ein Überleben von drei Monaten im Median erreichen. Für das Auftreten der thrombotischen Mikroangiopathie sind neben den non-Gal-Antikörpern, die das Endothel aktivieren (s.a. Kap. 1.4.2.), eventuell auch molekulare Inkompatibilitäten des Gerinnungssystems von Schwein und Pavian/Mensch verantwortlich (s.a. Kap. 4.4.).

Die Anti-Schwein-Antikörper konnten initial durch GAS 914 stark reduziert werden. Dies spricht für ihre Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Spezifität. Ab dem 5. postoperativen Tag stiegen sie jedoch trotz weiterer Applikation von GAS 914 an. Dies zeigt, dass es sich bei den induzierten Antikörpern zum großen Teil um anti-non-Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper handelt (siehe Abb. 3.6.), die gegen andere, noch nicht identifizierte, antigene Determinanten des Schweineendothels gerichtet sind. Der Versuch, mit dem anti-CD20-Antikörper Rituximab diese humorale Abstoßung zu verhindern, war weder bei uns noch anderen Arbeitsgruppen (McGregor 2005) erfolgreich. Da wir lediglich einen Versuch mit Rituximab durchführten, ist die Aussagekraft natürlich stark eingeschränkt. McGregor et al verwenden das Präparat jedoch regelmäßig und sehen immer eine AVR. Zwar werden die zirkulierenden B-Zellen zuverlässig eliminiert, aber weder die in den Lymphknoten ruhenden B-Lymphozyten noch die ausgereiften Plasmazellen, die die Immunglobuline produzieren, werden durch Rituximab angegriffen. Daher empfiehlt sich die Kombination mit einer Immunadsorption (Kaczmarek 2007) zur Entfernung aller Antikörper. Dies ist allerdings sehr invasiv und kann den gefährlichen Zustand der Hypogammaglobulinämie herbeiführen, in dem der Pavian sehr infekgefährdet ist.

Eine andere Möglichkeit, das Auftreten der induzierten anti-non-Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper zu verhindern, stellt die Co-Stimulationsblockade mittels anti-CD154-Antikörper dar (s.a. Kap. 1.4.2.). So wird die T-Zell-abhängige B-Zellaktivierung und Antikörperproduktion gehemmt. Im heterotopen Schwein-Pavian-Modell gelang dies der Arbeitsgruppe von David Sachs (Kuwaki 2004, Tseng 2005). Sie verwendeten Gal-knock-out-Schweine, als

Basisimmunsuppression MMF und Methylprednisolon, zur Induktion ATG, Cobra Venom Faktor, T-Zell-Antikörper und Thymusbestrahlung. Es wurde eine intensive Antikoagulation mit Heparin, Aspirin und Antithrombin durchgeführt, da eine häufige Nebenwirkung der anti-CD154-Antikörper-Therapie Thrombosen und Embolien sind. Unter dieser Therapie trat eine spontane Blutungskomplikation auf. Die Histologie nach knapp 6 Monaten ergab eine thrombotische Mikroangiopathie. Es bleibt weiterhin offen, ob diese durch eine persistierende Endothelzellaktivierung durch niedrige, nicht detektierbare Antikörpertiter (Kuwaki 2004, Tseng 2005) oder aber durch molekulare Inkompatibilitäten des Gerinnungssystems (s.a. Kap. 4.4.) bedingt ist. Bei diesem Protokoll handelt es sich um ein Immunsuppressionschema, das zwar auch mit zahlreichen unerwünschten Nebenwirkungen behaftet ist, einem an terminaler Herzinsuffizienz leidenden Patienten mit stark eingeschränkter Lebenserwartung aber zuzumuten wäre.

Die unabdingbare systemische Gerinnungshemmung, die man bei Verwendung des anti-CD154-Antikörpers durchführen muss (Bühler 2000), war bei unserer Versuchsreihe (orthotope Herztransplantation) problematisch, da nach einer Operation mit Herz-Lungen-Maschine die Blutungsgefahr selbst bei minutiöser Blutstillung ohnehin relativ hoch ist. Nur wenn ausreichend Fremdblutkonserven zur Verfügung stehen, kann man eine frühe systemische Antikoagulation wagen. Besser und weniger komplikationsträchtig wäre die Expression antikoagulatorisch wirkender Proteine auf dem Endothel (z.B. Thrombomodulin, CD39 etc.; s.a. Kap. 4.4.).

#### **4.3.3. Die Kombination Tacrolimus-Sirolimus-ATG zur Unterdrückung zellulärer Abstoßungsmechanismen**

Die Basisimmunsuppression Tacrolimus-Sirolimus-Steroide mit einer ATG-Induktionstherapie gilt als eines der sichersten Protokolle zur Vermeidung von akut zellulären Abstoßungsreaktionen in der klinischen Allotransplantation. In der Immunhistologie unserer explantierten Herzen fanden sich keine T-Lymphozyten, lediglich wenig granulozytäres

Infiltrat. Die Tatsache, dass Immunglobulinablagerungen und Thromben der vorherrschende Befund waren, könnte aber auch daran liegen, dass die T-Zell-abhängige Antikörperproduktion schneller auftritt als die akut-zelluläre Abstoßung, und es so immer zu einer humoralen Abstoßung kommt (Zhu 2007).

Im Verlauf unserer Versuchsreihe stellten wir die Applikation von Tacrolimus und Sirolimus von der intravenösen bzw. peroralen auf eine intramuskuläre um. Dies erleichterte den täglichen Umgang mit den Pavianen, gewährleistete aber vor allem durchwegs suffiziente Spiegel. Unsere Zielspiegel waren dieselben, die wir auch bei Allotransplantationen anstreben: 10-15 ng/ml bei Tacrolimus und 8-12 ng/ml bei Sirolimus. Dies kann als "moderat" bezeichnet werden, da z.B. McGregor et al. deutlich höhere Spiegel anstreben (20-30 ng/ml Tacrolimus, 10-20 ng/ml Sirolimus). Sie konnten dadurch trotz erhöhter Infektanfälligkeit ihr Langzeitüberleben nach heterotoper Herztransplantation hCD46 transgener Schweine verbessern. McGregor et al nahmen prophylaktisch Ganciclovir in das Therapieprotokoll mit auf; zusätzlich wurden bakterielle Infektionen (fast die Hälfte der Paviane) frühzeitig und großzügig antibiotisch therapiert (McGregor 2005). Aufgrund der Erfolge dieser Arbeitsgruppe werden auch im Rahmen dieses Forschungsprojektes zukünftig höhere Zielspiegel für Tacrolimus und Sirolimus angestrebt und versucht, der damit verbundenen erhöhten Infektanfälligkeit mit erweiterter Antibiose und virustatischer Therapie bzw. Prophylaxe beizukommen.

#### **4.3.4. Weitere Transgene und Immunsuppressiva**

Neben den Transgenen gegen die komplementvermittelte hyperakute Abstoßung (hDAF, hCD46, hCD59), gibt es auch solche, die posthyperakute Abstoßungsmechanismen unterdrücken sollen.

**TRAIL** (tumor necrosis factor- $\alpha$ -related-apoptosis-inducing ligand) ist in der Lage, nicht nur in Tumor- sondern auch in Plasmazellen Apoptose (= programmierter Zelltod) zu induzieren.

Darüber hinaus hemmt TRAIL den Zellzyklus von T-Zellen (Klose 2005). Auf diese Weise können akut-zelluläre Abstoßungsmechanismen gehemmt werden.

Die Expression von **HLA-E** auf dem Schweineendothel verhindert den Angriff durch NK-Zellen, da es ein Ligand für inhibitorische Rezeptoren der NK-Zellen ist (Crew 2007). Sowohl die direkte Lyse als auch die antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC), die einen wichtigen Bestandteil der akut-vaskulären und akut-zellulären Abstoßungsreaktion darstellt, können dadurch verhindert werden.

Mittlerweile ist es der Arbeitsgruppe von Eckart Wolf gelungen, dreifach-transgene Schweine (hDAF, TRAIL und HLA-E) zu produzieren, deren Testung im heterotopen Schwein-auf-Pavian-Modell gerade läuft.

Ein weiteres Ziel ist die Herstellung transgener Schweine, die **CTLA4-Ig** auf ihrem Endothel exprimieren, welches CTLA4-Rezeptoren auf T-Zellen blockieren kann. Die Interaktion von B7 auf Endothel- bzw. Antigen-präsentierenden-Zellen mit CD28/CTLA4 auf T-Zellen wird blockiert, wodurch das zweite Signal der Lymphozytenaktivierung (Co-Stimulation) und damit auch die T-Zell-abhängige Antikörperproduktion unterbleiben. Die Möglichkeit der systemischen Co-Stimulationsblockade besteht auch mit einem **anti-CD28-Antikörper** (Shiao 2006), der aber erst im orthotopen Schwein-Pavian-Modell getestet werden muss.

Nagy et al. (Nagy 2002) entwickelten einen humanen Antikörper gegen MHC-Klasse II-Moleküle (**anti-HLA-DR-Antikörper**). Diese Moleküle befinden sich auf B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen. In vitro zeigte sich der Antikörper sehr wirksam gegen Leukämie- und Lymphomzellen mit vielen Mitosen. Ruhende B-Zellen werden von anti-HLA-DR leider wenig beeinflusst, was die Wirksamkeit gegen die AVR einschränkt.

Lösliche **Fc-Rezeptoren** binden Immunglobuline, so dass diese nicht mehr mit ihrem Fc-Teil an Immunzellen binden und Effektorfunktionen (T- und B-Zellproliferation, Zytokinausschüttung, Antikörperproduktion etc.) auslösen können (Nimmerjahn 2006). Auch



sie müssen erst im orthotopen Schwein-Pavian-Modell auf Wirkung und Verträglichkeit getestet werden.

Ein theoretisch ideales Immunsuppressionsschema, das sämtliche Abstoßungsmechanismen abdecken würde, könnte folgendermaßen aussehen:

- Verwendung von Gal-knock-out-Schweinen, die gleichzeitig multitransgen sind (DAF, TRAIL, HLA-E)
- anti-Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörpertherapie mit GAS 914
- Co-Stimulationsblockade mit anti-CD40L gegen induzierte anti-non-Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper
- Basisimmunsuppression mit Tacrolimus, Sirolimus und Steroiden
- Induktionstherapie mit niedrigdosiertem Cyclophosphamid (20 mg/kg - 10 - 10).
- Therapie von akuten Abstoßungsreaktionen mit ATG oder Kortisonstoßtherapie.

Die Herausforderung der Zukunft wird es bleiben, ein immunologisch sicheres, aber möglichst nebenwirkungsarmes Regime zu etablieren.

#### **4.3.5. Akkommodation und Toleranz**

Von **Akkommodation** spricht man, wenn ein Transplantat nicht abgestoßen wird, obwohl Antikörper, die gegen es gerichtet sind und normale Komplementspiegel vorhanden sind. Akkommodation kann erreicht werden, wenn in der perioperativen Phase eine intensive Immunsuppression mit Entfernung aller xenoreaktiver Antikörper erfolgt. Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt. Man nimmt an, dass die wiederkehrenden Antikörper oder die Antigene sich strukturell verändern (Andres 1996). Akkommodation wird auch in Zusammenhang mit der Expression protektiver Gene gebracht. Darunter fallen *A20* und *AI*, die sowohl antiapoptotisch wirken als auch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B blocken und so eine proinflammatorische Antwort des Gefäßendothels (Endothelzellaktivierung) verhindern,

die der Ausgangspunkt für eine Abstoßung ist (Bach 1997). Ein weiteres wichtiges protektives Gen ist *Hämoxygenase-1 (HO-1)*: In Ratten transplantierte *HO-1*-defiziente Mäuseherzen wurden deutlich schneller und heftiger abgestoßen, da sie kein CO (Carbonmonoxid) produzieren können, welches einen vasodilatierenden Effekt hat (Soares 1998, Sato 2001).

Obwohl es mittlerweile in der Klinik bei ABO-inkompatiblen Allotransplantationen möglich ist, einen Zustand der Akkommodation herbeizuführen (Stussi 2006), konnte dies im diskordanten Schwein-Pavian-Modell bisher nicht erreicht werden.

Unter **Toleranz** versteht man einen Zustand der Akzeptanz des Empfängers gegenüber einem fremden Spenderorgan bei vollständigem Erhalt der Immunkompetenz gegenüber sonstigen Antigenen. Nachdem der Zustand der Toleranz einmal induziert ist, sind keine Immunsuppressiva mehr nötig.

Zum ersten Mal beschrieben wurde der Mechanismus Mitte der 40er Jahre (Owen 1945). Eine Möglichkeit, Toleranz gegenüber Spenderantigenen zu erzielen, besteht in der Induktion eines *gemischten hämatopoietischen Chimärismus*: nach einem Konditionierungsschema zur Deletion von T- und B-Zellen (Ganzkörperbestrahlung, Cyclophosphamid, Thymusbestrahlung, ATG, Splenektomie) wird das Organ zusammen mit dem Knochenmark des Spenders transplantiert. So kolonialisieren sowohl hämatopoietische Zellen des Spenders als auch des Empfängers Knochenmark und Thymus. Durch negative Selektion werden nun sowohl selbst-reaktive als auch Spender-reaktive T-Zellen eliminiert (klonale Deletion). Die so entstandene zentrale Toleranz hält, so lange der Chimärismus persistiert.

Mittlerweile sind mit dieser Strategie bereits erste klinische Erfahrungen gesammelt worden: am Massachusetts General Hospital wurden Patienten mit multiplem Myelom und Niereninsuffizienz im Endstadium kombiniert Niere und Knochenmark transplantiert, wobei ein Patient seit 5 Jahren ohne Immunsuppressiva lebt (Spitzer 1999, Buhler 2002).

Im diskordanten Schwein-Pavian-Modell treten jedoch mehrere Probleme auf: erstens gelingt die Ansiedelung porciner hämatopoietischer Stammzellen bedingt durch Phagozytose (Tseng 2005) nicht in ausreichendem Masse, zweitens kommt es durch deren Infusion zu thrombotischer Mikroangiopathie (Buhler 2000 und 2001) und drittens besteht zwischen ihnen und den Wachstumsfaktoren des Empfängers eine molekulare Inkompatibilität (Sablinsky 1999). Deshalb ist es bisher nicht gelungen, einen langfristigen gemischten hämatopoietischen Chimärismus im diskordanten Xenotransplantationsmodell zu erreichen.

Die zweite Möglichkeit zur Induktion zentraler Toleranz besteht in der Co-Transplantation von Thymusgewebe, am besten vaskularisiert als Herz-en-bloc-Thymustransplantation (Johnston 2005), nach Thymektomie oder Thymusbestrahlung und T-Zell-Depletion des Empfängers. Die juvenilen T-Zellen des Empfängers wandern zum Schweinethymus, wo gegen Schweineantigene gerichtete T-Zellen negativ selektioniert werden (klonale Deletion, s.o.). Die so entstandene spenderspezifische T-Zell-Toleranz kann die zelluläre Abstoßung und die T-Zell-abhängige Antikörperproduktion verhindern, nicht jedoch die humorale Abstoßung durch natürliche Antikörper (Yamada 2005). Im Xenotransplantationsmodell ist daher auch eine B-Zell-Toleranz dringend erforderlich. Die zweite Limitierung liegt in der natürlichen Involution des Thymus mit zunehmendem Alter, so dass die Co-Transplantation von Thymusgewebe auf pädiatrische Patienten beschränkt bleibt (Madsen 2005).

Die Induktion donorspezifischer Toleranz gegenüber Schweineorganen ist sicherlich ein sehr komplexer Ansatz zur Lösung der Abstoßungsproblematik. Die fehlende Notwendigkeit einer lebenslangen Immunsuppression wäre für Organempfänger aber von unschätzbarem Vorteil, da die Anfälligkeit für Infektionen und Tumoren und Nebenwirkungen wie Nephrotoxizität, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und Hypertonie entfallen würden. Auch das Problem der chronischen Abstoßung – soweit sie durch immunologische Prozesse bedingt ist (Hancock 1998) – wäre gelöst. Die Nachsorge der Transplantierten wäre deutlich unkomplizierter und

billiger, weil sie weniger Immunsuppressiva-induzierte Begleiterkrankungen hätten. Auch die Lebensqualität nach Organtransplantation könnte damit weiter verbessert werden.

#### **4.3.6. Splenektomie**

Da die Milz ein wichtiger Herstellungsort der B-Lymphozyten ist, mag es sinnvoll erscheinen, in Erwartung einer humoralen Abstoßungsreaktion vor einer Xenotransplantation eine Splenektomie durchzuführen. Über die Effektivität der Splenektomie gibt es in der Literatur unterschiedliche Ergebnisse. Zaidi beschrieb niedrigere Titer der induzierten Anti-Schwein-Antikörper in splenektomierten Cynomolgusaffen nach Transplantation hDAF-transgener Schweinenieren (Zaidi 1997). Kobayashi konnte keinen Überlebensvorteil bei splenektomierten Pavianen nach Schweineherztransplantation feststellen. (Kobayashi 1997). In dieser Versuchsserie wurde auf die Splenektomie verzichtet, da es sich um einen schmerzhaften abdominalen Eingriff mit potentieller Blutungs- und Infektionsgefahr handelt, und der gute Ausgangshämoglobinwert unserer Versuchstiere nicht gefährdet werden sollte.

#### **4.3.7. Bestrahlung**

Eine Ganzkörperbestrahlung verursacht den Tod von sich rasch teilenden Zellen, wie z.B. malignen Tumorzellen und hämatopoietischen Zellen. Daher ist sie ein fester Bestandteil von Therapieprotokollen bei Knochenmarkstransplantation.

Eine temporäre Ablation von B-Zellen (nicht aber der Plasmazellen) und damit eine Reduktion der Antikörperproduktion gelingen mit einer Ganzkörperbestrahlung von 300 Gy (Clave 1995, Kozlowski 1998). Dieser Effekt ist aber nur kurzfristig, da die B-Zellen sich rasch erholen.

Ein effektives Mittel zur Verhinderung bzw. Therapie der akut-vaskulären Abstoßungsreaktion stellt die Bestrahlung derzeit nicht dar. Aus diesem Grunde und wegen der toxischen Nebenwirkungen wie Anämie, Thrombopenie und Agranulozytose wurde sie in

dieser Versuchsserie nicht eingesetzt. Überdies kann eine Bestrahlung eine thrombotische Mikroangiopathie triggern (Robson 2000).

## **4.4. Gerinnungsproblematik in der Xenotransplantation**

### **4.4.1. Gerinnungsaktivierung durch Abstoßung und molekulare Inkompatibilitäten**

Die disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) tritt unabhängig vom Immunsuppressionsschema regelhaft bei der Abstoßung eines Xenotransplantats auf. Zum einen wird die Gerinnung durch die immunologische Reaktion aktiviert (siehe 1.3.1. und 1.3.2.), zum anderen gibt es Hinweise darauf, dass zwischen Schwein und Mensch molekulare Inkompatibilitäten bestehen, die vermutlich selbst dann zu einer DIC führen könnten, wenn die akut vaskuläre Abstoßungsreaktion überwunden werden kann (Robson 2000, Kuwaki 2004). Welcher der beiden Mechanismen der wichtigere für die Gerinnungsaktivierung ist, steht derzeit noch nicht endgültig fest (Byrne 2006, Cowan 2007).

#### Porcines Thrombomodulin und humanes Protein C:

##### *Normale Physiologie:*

Thrombomodulin ist ein Oberflächenprotein der Endothelzellen. Es bringt zum einen Thrombin in einen antikoagulatorischen Zustand und aktiviert zum anderen Protein C, das zusammen mit seinem Kofaktor Protein S die Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa proteolytisch spaltet und damit inaktiviert.

##### *Pathophysiologie:*

Porcines Thrombomodulin ist - zumindest in vitro - nicht in der Lage, in ausreichendem Masse humanes Protein C zu aktivieren und bringt Thrombin nicht in einen antikoagulatorischen Zustand. (Siegel 1997, Kopp 1998).

### Porciner Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) und humaner Faktor X:

#### *Normale Physiologie:*

TFPI auf der Endothelzelloberfläche bindet und inaktiviert Faktor Xa. Des Weiteren bindet und inaktiviert der Komplex TFPI/Xa den Komplex TF/VIIa in der Initialphase der exogenen Gerinnungsaktivierung.

#### *Pathophysiologie:*

Porciner TFPI kann humanen Faktor Xa nicht in ausreichendem Masse inaktivieren (Kopp 1997).

### Porcine Endothelzellen und humanes Prothrombin:

Porcine Endothelzellen können humanes Prothrombin direkt aktivieren. So entsteht Thrombin ohne Beteiligung weiterer plasmatischer Gerinnungsfaktoren (Siegel 1997).

### Porciner von Willebrand Faktor und humane Thrombozytenrezeptoren:

Porciner vWF zeigt ein erhöhtes Potential an humanes Thrombozyten Glykoprotein Ib zu binden (Schulte am Esch II 1997) und damit spontan die Plättchenaggregation zu fördern. Diesem Mechanismus kommt besondere Bedeutung zu, da der subendothelial gelegene vWF bei abstoßungsbedingter Endothelzellretraktion an die Oberfläche gerät und zu massiver Aggregation zirkulierender Thrombozyten noch vor Aktivierung des Gerinnungssystems führt.

### Porciner Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-I:

Porciner PAI-I auf dem Endothel tritt bei Xenotransplantation in höheren Konzentrationen auf (Fay 1996, Kalady 1998) und hemmt die Fibrinolyse. Dieser Mechanismus trägt zur thrombotischen Mikroangiopathie bei.

#### 4.4.2. Gerinnungshemmung

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden antikoagulatorische Maßnahmen im Xenotransplantationsmodell getestet, die zu unterschiedlichen Ergebnissen führten. Zum einen besteht die Möglichkeit **systemischer Antikoagulation** mit dem großen Nachteil möglicher Blutungskomplikationen, wobei im Schwein-Pavian-Modell weder die Gabe von niedermolekularem Heparin oder Warfarin (Byrne 2005) noch eine Hochdosis-Antithrombin (Cozzi 2005) oder effektive Anti-Thrombozytentherapie mit Aspirin und Clopidogrel (Schirmer 2004) zum Erfolg führten. Andere Studien kamen zu dem Schluss, dass die Applikation von Heparin und Aspirin das Ergebnis nach Xenotransplantation von  $\alpha$ -Gal-knock-out-Schweinen in Paviane verbessert (Tseng 2005). Auch wir führten eine Studie im Langendorff-Perfusionsmodell mit systemischer Gerinnungshemmung durch (Brandl 2005): hDAF-transgene und Landrasseschweineherzen wurden jeweils mit Humanblut mit bzw. ohne den Zusatz des Thrombozyten-Fibrinogen-Rezeptor-(Glykoprotein IIb/IIIa)-Antagonisten Tirofiban perfundiert, wobei sich in der Tirofibangruppe weniger Fibrinablagerungen und Thromben im Transplantat zeigten, und der myokardiale Schaden geringer war. Zu demselben Ergebnis kam auch die Arbeitsgruppe um Bach (Candinas 1996, Robson 1996). Die Hemmung der Thrombozytenaggregation durch Verwendung von P-Selectin-(Thrombozyten-Adhäsionsmolekül) oder PAF-(platelet activating factor) Antagonisten (Makowka 1990, O'Hair 1993, Coughlan 1993) oder die Infusion löslicher ATPDase (Koyamada 1996) zeigten eine Verlängerung des Überlebens in diskordanten Xenotransplantationsmodellen.

Die direkte Hemmung von Thrombin mittels eines peptidomimetischen synthetischen Thrombininhibitors wurde ex vivo getestet (Robson 1996). Schweineherzen wurden mit Humanblut perfundiert. Die Thrombinhemmung führte zu einem verlängerten Überleben, verbesserter Organfunktion und weniger Fibrineinlagerungen in der Histologie. Eine systemische Toxizität schließt die Verwendung dieser Substanz bei Grossterversuchen jedoch aus.

Hirudin wird entweder aus den Speicheldrüsen des Blutegels gewonnen oder rekombinant hergestellt. Im Gegensatz zu Heparin hemmt es Thrombin direkt, unabhängig vom Antithrombin III-Spiegel. In der Klinik wird es zur Therapie der heparininduzierten Thrombozytopenie II mit thrombembolischen Komplikationen eingesetzt. Im working-heart-Modell zeigte sich unter seiner Verwendung eine längere Laufzeit, ein höheres Herz-Zeit-Volumen und ein besserer Koronarfluss als in der Kontrollgruppe mit Heparin (Brenner 2003). Die durch Bindung von porcinem vWF an GlykoproteinIb ausgelöste Thrombozytenaggregation kann durch die Vasodilatoren Nitroprussid und Prostazyklin, die beide den cAMP- bzw. cGMP-Spiegel erhöhen, erheblich reduziert werden (Francesconi 1996). Spezifische vWF-Inhibitoren (Aurin-Tricarboxylase) zeigten sich bei In-vitro-Versuchen effizient (Schulte am Esch 1997).

Besser als systemische Antikoagulation sind **genetische Strategien zur Hemmung der Gerinnungskaskade** an ganz bestimmten Punkten:

*CD 39* ist ein Membranprotein der Endothelzellen, das ATP und ADP zu AMP und schließlich zu dem antithrombotisch und antiinflammatorisch wirkenden Mediator Adenosin umwandelt (Gefäß-ATPDase). Bei der Aktivierung der Endothelzelle durch Antikörperbindung geht die Aktivität von *CD 39* durch oxidativen Stress verloren, und der Thrombozytenaktivator ADP kumuliert. Die Überexpression von *humanem CD 39* führte im Mausmodell zu einem verlängerten Überleben (Dwyer 2004), während es bei Fehlen dieses Proteins zu deutlich heftigeren Thrombosen kam. Inselzellen von *CD 39*-transgenen Mäusen, die mit Humanblut perfundiert wurden, zeigten im Vergleich zu nicht transgenen vernachlässigbare Thrombenbildung (Dwyer 2006). Gute Ergebnisse in Bezug auf Überleben brachte auch die systemische Anwendung löslicher ATPDasen (s.o), wobei eine lokale Expression immer mit weniger Nebenwirkungen vergesellschaftet ist.

Im Maus-Ratten-Modell konnte die Expression von *humanem tissue-factor-pathway-inhibitor (hTFPI)* die Thrombenbildung komplett unterbinden (Chen 2004). Die Expression von



*humanem Thrombomodulin (hTM)* auf porcinen Endothelzellen führte in Anwesenheit von humanem Thrombin zu einer 620-fach höheren Aktivierung von humanem Protein C als in der Kontrollgruppe (Kopp 1998). Pankreaszellen wurden durch Expression von *humaner Hämoxygenase-1 (hHO-1)* vor Apoptose geschützt und zeigten darüber hinaus eine verbesserte physiologische Funktion (Li 2006). All diese positiven, in Kleintiermodellen und in-vitro-Studien gewonnenen Ergebnisse müssen jedoch im Schwein-Pavian-Modell evaluiert werden. Schweine, die zusätzlich zu Komplementregulatoren auch *humanes Thrombomodulin (hTM)* und *humane Hämoxygenase-1(hHO-1)* auf ihrem Endothel überexprimieren, werden momentan durch somatischen Kerntransfer in der Abteilung für Biotechnologie am Institut für Tierzucht Mariensee (Neustadt, Deutschland) hergestellt. In diesem Zusammenhang wird auch versucht, mit Hilfe eines siRNA-Konstrukts eine niedrige Expression von *tissue factor (TF)* zu erreichen. Hierbei handelt es sich um eine neuartige Technik zur Stilllegung von Genen durch Einbringen sog. short interfering-RNAs in das Genom (Tuschl 2002, Hofmann 2003).

Die Gerinnungsproblematik stellt neben der Abstoßung die größte Herausforderung bei diskordanter Xenotransplantation dar. Die disseminierte intravasale Gerinnung muss mit Hilfe antikoagulatorischer Maßnahmen verhindert werden, während gleichzeitig eine ausreichende Hämostase für die chirurgische Blutstillung vorhanden sein muss.

#### **4.5. Infektiologie in der Xenotransplantation**

Derzeit werden in der Klinik häufig wesentlich Erreger wie z.B. Cytomegalievirus (CMV) oder Epstein-Barr-Virus (EBV) mit dem Organ transplantiert, um den Spenderpool zu erweitern. Nicht selten entwickeln die immunsupprimierten Empfänger CMV-Infektionen, deren Therapie mit Ganciclovir starke Nebenwirkungen hat (v.a. Leukopenie), die unter Umständen sogar tödlich sein können. Bei Verwendung von Schweinen als Organspender

wäre es möglich, im Vorfeld alle relevanten Mikroorganismen wie Hepatitis E Viren, lymphotrope Herpesviren, Schweine-Cytomegalievirus, Circovirus etc. zu detektieren, gezielt keimfreie Linien zu züchten und diese auch in SPF-Haltungen (*specific pathogen free*) unterzubringen.

Besonderes Augenmerk wird in diesem Zusammenhang auf porcine endogene Retroviren (PERVs) gelegt. Sie werden im Genom aller Schweine als DNA-Proviren gefunden und sind in der Lage, humane Zellen *in vitro* zu infizieren (Patience 1998). Es gibt bisher jedoch keinen einzigen Fall einer PERV-Infektion bei bisher durchgeführten klinischen Xenotransplantationen (porcine Inselzellen, porcine neuronale Zellen, porcine Haut, extrakorporale Leberperfusion; Paradis 1999). Man nimmt an, dass PERVs wie andere Retroviren, Tumoren und Immunschwächen hervorrufen könnten.

Es gibt verschiedene Ansätze, die die Verminderung des Infektionsrisikos mit PERV zum Ziel haben:

Verschiedene Schweine und Schweinestämme setzen unterschiedliche Mengen an PERV frei. Durch Selektion ist es mit konventionellen Zuchtmethoden gelungen, einen Schweinestamm zu etablieren, der keine PERVs freisetzt (Oldmixon 2002). Alternativ können die PERVs aus dem Genom der Schweine mittels "Knock-out"-Technologie eliminiert werden oder deren Expression mit Hilfe der siRNA (small interfering RNA)-Technologie (s.a Kap. 4.4.2.) verhindert werden (Karas 2004). Die Herstellung eines Impfstoffes gegen PERV könnte eine Infektion verhindern (Fiebig 2003).

Solange die Infektion auf den Organempfänger, der ohne Transplantation versterben würde, beschränkt bliebe, wäre das Risiko vertretbar. Sollte sich jedoch herausstellen, dass sich PERV-Infektionen horizontal im Umfeld des Transplantierten ausbreiten können, wären die Folgen für die Allgemeinheit katastrophal. Bis dies abschließend geklärt ist, müssen sich die Patienten und ihre Angehörigen ständigen diagnostischen Maßnahmen und eventuell einer temporären Isolierung bei Verdacht auf PERV-Infektion unterziehen.

## **4.6. Ethische Aspekte der Xenotransplantation**

Die Xenotransplantation eröffnet der Medizin große Chancen, wirft aber auch ethische Fragen auf.

In Deutschland werden jedes Jahr 40 Millionen Schweine zum Verzehr geschlachtet. Es erscheint daher ethisch unbedenklich, ein paar tausend zusätzlich als Organquelle für lebensrettende Transplantationen zu verwenden. Auch die großen Weltkirchen Christentum, Islam, und Judentum haben keine grundsätzlichen religiösen Argumente gegen die Xenotransplantation. Obwohl für Moslems und Juden das Schwein ein „unsauberes“ Tier ist und deswegen nicht verzehrt werden darf, ist es ihrer Meinung nach vertretbar, Schweineorgane zu verwenden, um Leben zu retten (Welin 2006).

Dennoch argumentieren manche Tierschützer, dass vor allem Schweinen, die humane Transgene in sich tragen, auch menschliche Rechte zu gewähren sind und lehnen daher die Tötung dieser Tiere sogar für lebensrettende Transplantationen ab.

Bezüglich der Akzeptanz von Schweineorganen unter potentiellen Empfängern gibt es unterschiedliche Ergebnisse: die Befragung von 214 Typ 1 Diabetikern in Frankreich ergab, dass 70 % von ihnen die Transplantation von porcinen Inselzellen wegen potentiellen Infektionsrisiken bzw. Nebenwirkungen der Immunsuppressiva ablehnen würden (Deschamps 2005). Diabetiker in England und Australien würden hingegen Schweineinseln zu 68 bzw. 85% als Therapieform akzeptieren (Ellison 2006). Würde diese Umfrage bei terminal Herzkranken durchgeführt werden, die keine andere therapeutische Option mehr haben, wäre die Akzeptanz eines Schweineorgans wahrscheinlich nahe 100%.

## **4.7. Wirtschaftliche Aspekte der Xenotransplantation**

Die Kosten-Nutzen-Analyse der Allo-Nierentransplantation im Vergleich zur Dialyse zeigt eine Kostenersparnis nach 10 Jahren von ca. 100000 € pro Patient (Nagel 1999) zugunsten der

Transplantation. Hinzu kommen bei allen Organtransplantationen (Herz, Niere, Lunge, Leber, Pankreas, Dünndarm) eine wesentliche Verbesserung der Lebensqualität und die Möglichkeit einer erneuten Eingliederung ins Berufsleben. Dies würde eine kostenaufwendige Frühberentung ersparen. Aufgrund des Organmangels können viel zu wenige Patienten dieser besseren und kostengünstigeren Behandlungsmethode zugeführt werden. Die Xenotransplantation könnte hier dem Gesundheitswesen viel Geld sparen, selbst wenn initial der Aufwand im Vergleich zur Allotransplantation aufgrund der Entwicklungskosten sicherlich höher sein wird.

Nicht unerheblich wiegen die Kosten einer lebenslangen Immunsuppression. Herztransplantierte leben länger als Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz, die konservativ behandelt werden. Aus Kostengründen eine überlegene Therapieform den Patienten vorzuenthalten ist jedoch unethisch und daher abzulehnen.

Ein weiterer positiver Aspekt einer Realisierung der Xenotransplantation wäre die Schaffung von Arbeitsplätzen in der Biotechnologischen Industrie und der Pharmaindustrie.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die Xenotransplantation stellt eine mögliche Lösung des Organmangels in der Transplantationsmedizin dar. Dabei hat sich das Schwein aufgrund ethischer Unbedenklichkeit, einer kurzen Tragzeit, vieler Nachkommen und einem schnellen Wachstum als das am besten geeignete Spendertier herauskristallisiert. Da Schweine jedoch nur sehr weit entfernt mit dem Menschen verwandt sind, tritt sofort nach Organtransplantation eine besonders heftige Abstoßungsreaktion (sog. **hyperakute Abstoßung**) auf, die durch das Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Epitop auf Schweineendothelzellen und die präformierten, natürlichen anti-Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper im Serum des Menschen bedingt ist. Es kommt zur komplementvermittelten Zellyse und zur Zerstörung des Transplantats innerhalb von 24 Stunden. Heute kann die hyperakute Abstoßung mit Hilfe von verschiedenen Strategien fast immer verhindert werden. In der vorliegenden Studie gelang dies durch Verwendung transgener Schweine, die den humanen Komplementregulator DAF auf ihrem Endothel exprimierten, sowie durch die tägliche Applikation von GAS 914, einem infundierbaren Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Trisaccharid, das die natürlichen anti-Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper bindet und neutralisiert.

Wenn die hyperakute Abstoßung überwunden ist, gilt es, die nach Tagen einsetzende **akut-vaskuläre Abstoßung** zu verhindern, die größtenteils durch induzierte anti-non-Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper verursacht wird. Dies gelang bisher nur in seltenen Fällen und auch nur mit Immunsuppressionsschemata, die aufgrund schwerwiegender Nebenwirkungen ein Langzeitüberleben verhinderten.

Ziel der vorliegenden Studie war es, basierend auf den Vorarbeiten von Schmoeckel et al. (Schmoeckel 1998), ein verlängertes Überleben nach orthotoper Herztransplantation hDAF-transgener Schweineherzen in Paviane unter *moderater* Immunsuppression zu erreichen. Hierfür wurden 12 Paviane transplantiert. Die Basisimmunsuppression bestand aus

Tacrolimus, Sirolimus, Steroiden, ATG und GAS914. Drei Paviane überlebten länger als eine Woche: einer davon mit Basisimmunsuppression neun Tage, zwei mit Cyclophosphamid 14 bzw. 25 Tage, allerdings nur mit der Hälfte der bis dahin gebräuchlichen Dosierung. Alle Herzen zeigten in der histologischen Aufarbeitung postmortem Zeichen einer akut-vaskulären Abstoßung mit Immunglobulin- und Komplementablagerungen entlang des Endothels, interstitiellen Hämorrhagien und thrombotischen Gefäßverschlüssen. Es fand sich kein bzw. sehr wenig monozelluläres Infiltrat. Daraus lässt sich schließen, dass Cyclophosphamid als B-Zelltherapeutikum die akut-vaskuläre Abstoßung zwar nicht verhindern, ihr Auftreten aber deutlich verzögern kann. Hierfür reicht eine moderate Dosierung aus, die weniger toxisch ist. Als noch effektiver hat sich in jüngster Vergangenheit die sog. Co-Stimulationsblockade mit einem anti-CD154-Antikörper gezeigt (Kuwaki 2004, Tseng 2005), mit der es sogar gelungen ist, das Auftreten der induzierten anti-non-Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Antikörper im Blut des Empfängers zu verhindern. In der Histologie zeigten diese Herzen deutlich weniger Immunglobulinablagerungen, aber unverändert thrombotische Gefäßverschlüsse, die auch auf molekulare Inkompatibilitäten der Gerinnungssysteme von Schwein und Pavian zurückgeführt werden können. In Zukunft wird die Herstellung transgener Schweine daher auch auf die Expression antikoagulatorisch wirkender Proteine auf dem Gefäßendothel abzielen müssen.

Das ultimative Ziel in der Xenotransplantation, wie auch in der Allotransplantation, wäre die Erzeugung immunologischer Toleranz gegenüber dem Spenderorgan, sodass keine Immunsuppression mit toxischen Nebenwirkungen für den Empfänger mehr erforderlich wäre. Eine weitere Herausforderung stellen die porcinen endogenen Retroviren (PERVs) dar. Sie werden im Genom aller Schweine als DNA-Proviren gefunden und sind in der Lage, humane Zellen *in vitro* zu infizieren (Patience 1998). Es gibt bisher jedoch keinen einzigen Fall einer PERV-Infektion bei klinischen Xenotransplantationen (Paradis 1999). Eine sorgfältige

Überwachung der Patienten wird in jedem Falle, vor allem auch zum Schutz der Allgemeinbevölkerung erforderlich sein.

Im Jahre 2000 setzte die International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT) die Bedingungen für den Start einer klinischen Studie fest: die Drei-Monats-Überlebensrate in einer konsekutiven Versuchsreihe orthotoper Herztransplantationen mit Primaten muss mindestens 60% betragen, wobei mindestens 10 Tiere drei Monate überleben müssen (Cooper 2000). Als erstes wird vermutlich die Transplantation porciner Pankreasinseln Einzug in die Klinik finden, da hierbei das Risiko für den Patienten am geringsten ist.

Neben der Xenotransplantation sollten jedoch auch die alternativen Möglichkeiten wie Assist devices, Stammzelltherapie und Tissue Engineering weiterentwickelt werden, um dem Patienten individuell die für ihn beste Therapieform anbieten zu können.

## 6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
Ag	Antigen
AK	Antikörper
APA	Anti-Schwein-Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATG	Anti-Thymozyten-Globulin
AVR	akut vaskuläre Abstoßungsreaktion
CMV	Cytomegalievirus
CPB	Cardiopulmonaler Bypass
CTLA4-Ig	zytotoxisches T-Lymphozyten assoziiertes Antigen 4-Immunglobulin
CVF	Cobra Venom Faktor
CyA	Cyclosporin A
CyP	Cyclophosphamid
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
EF	Ejektionsfraktion
FK506	Tacrolimus
Gal	Galaktose
GP1IbIIIa	GlykoproteinIIbIIIa
Gy	Gray (1 Gy = 1 J/kg)
HAR	hyperakute Abstoßungsreaktion
hDAF	humaner Decay Accelerating Factor
hTM	humanes Thrombomodulin
hHO-1	humane Hämoxygenase-1
ICD	Interner Cardioverter Defibrillator
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
IMPDH	Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase
i.v.	intravenös
MAC	Membran-Angriffs-Komplex
MCP	Membran-Cofaktor-Protein = CD46
MCP-1	Monozyten chemotaktisches Protein-1



MMF	Mycophenolat Mofetil
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PA	Pulmonalarterie
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PERV	Porcines endogenes Retrovirus
PNAK	präformierte natürliche Antikörper
p.o.	per os
PTLE	Post-Transplantations-Lymphoproliferative Erkrankung
RCA	Regulator der Komplementaktivierung
s.c.	subkutan
sCR-1	löslicher Komplementrezeptor Typ 1
Sir	Sirolimus
siRNA	short interfering RNA
SPF	spezifisch pathogenfrei
Tac	Tacrolimus
TF	tissue factor
TFPI	tissue factor pathway inhibitor
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TRAIL	TNF $\alpha$ -related apoptosis inducing ligand
vWF	von-Willebrand-Faktor
ZAR	zelluläre Abstoßungsreaktion

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

- Alwayn IP, Basker M, Buhler L, Cooper DK. The problem of anti-pig antibodies in pig-to-primate xenografting: current and novel methods of depletion and/or suppression of production of anti-pig antibodies. *Xenotransplantation* 1999, 6: 157-168
- Andersen HO: Heart allograft vascular disease. An obliterative vascular disease in transplanted hearts. *Atherosclerosis* 1999, 142: 243-263
- Andres G, Yamaguchi N, Brett J, Caldwell PRB, Godman G, Stern D. Cellular mechanisms of adaption of grafts to antibody. *Transplantation Immunology* 1996, 4: 1-17
- Anrather D, Millan MT, Palmethofer A, Robson SC, Geczy C, Ritchi AJ, Bach FH, Ewenstein BM. Thrombin activates nuclear factor-kappa-b and potentiates endothelial cell activation by TNF. *Journal of Immunology* 1997, 159: 5620-5628
- Atkinson JP, Oglesby TJ, White D, Adams EA, Liszewski MK. Separation of self from non-self in the complement system: a role for membrane cofactor protein and decay accelerating factor. *Clinical experimental Immunology* 1991, 86: 27-30
- Bach FH, Ferran C, Hechenleitner P, Mark W, Koyamada N, Myatake T, Winkler H, Badrichani A, Cardinas D, Hancock WH. Accommodation of vascularized xenografts: Expression of 'protective genes' by donor endothelial cells in a host Th2 cytokine environment. *Nature Medicine* 1997, 3: 196-204
- Bach FH, Winkler H, Ferran C, Hancock WW, Robson SC. Delayed xenograft rejection. *Immunology Today* 1996, 17: 379-384
- Bailey LL, Nehlsen-Cannarella SL, Concepcion W, Jolley WB. Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate. *JAMA* 1985, 254: 3321-3329
- Barnard CN, Wolpowitz A, Losman JG. Heterotopic cardiac transplantation with a xenograft for assistance of left heart in cardiogenic shock after cardiopulmonary bypass. *South African Medical Journal* 1977, 52: 1035-1038

- Barnes AD, Hawker RJ. Leukocyte antigens in baboons: a preliminary to tissue typing for organ grafting. *Transplantation Proceedings* 1972, 4: 37-42
- Brandl U, Michel S, Erhardt M, Brenner P, Bittmann I, Rössle M, Baschnegger H, Bauer A, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B. Administration of GAS914 in an orthotopic pig-to-baboon heart transplantation model. *Xenotransplantation* 2005, 12: 134-141
- Brandl U, Erhardt M, Joeckle H, Michel S, Brenner P, Bittmann I, Rössle M, Mordstein V, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B. Combining the hDAF transgene with the GP IIb/IIIa inhibitor tirofiban improves heart performance and reduces myocardial damage following hyperacute rejection in an ex vivo perfusion model. *Transplantation Proceedings* 2005, 37: 491-492
- Brandl U, Erhardt M, Michel S, Jöckle H, Burdorf L, Bittmann I, Rössle M, Mordstein V, Brenner P, Hammer C, Reichart B, Schmoeckel M. SolubleGal $\alpha$ (1,3)Gal conjugate combined with hDAF preserves morphology and improves function of cardiac xenografts. *Xenotransplantation* 2007, 14: 323-332
- Brenner P: Einfluss von Immunadsorption auf xenogene Abstoßungsmechanismen im Perfusionsmodell und bei der Xenotransplantation von Landrasse- und hDAF-transgenen Schweineherzen in Primaten. (Habilitationsschrift 2003)
- Brenner P, Reichenspurner, Schmoeckel M, Wimmer C, Rucker A, Eder V, Meiser B, Hinz M, Felbinger T, Müller-Höcker J, Hammer C, Reichart B. IG-therasorb immunoapheresis in orthotopic xenotransplantation of baboons with landrace pig hearts. *Transplantation* 2000, 69: 208-214
- Buhler L, Awwad M, Basker M, Gojo S, Watts A, Treter S, Nash K, Oravec G, Chang Q, Thall A, Down JD, Sykes M, Andrews D, Sackstein R, White-Scharf ME, Sachs DH, Cooper DK. High-dose porcine hematopoietic cell transplantation combined with CD40 ligand blockade in baboons prevents an induced anti-pig humoral response. *Transplantation* 2000, 69: 2296-2304

- Buhler L, Basker M, Alwayn IP, Goepfert C, Kitamura H, Kawai T, Gojo S, Kozlowski T, Ierino FL, Awwad M, Sachs DH, Sackstein R, Robson SC, Cooper DK. Coagulation and thrombotic disorders associated with pig organ and hematopoietic cell transplantation in non-human primates. *Transplantation* 2000, 70:1323-1331
- Buhler L, Goepfert C, Kitamura H, Basker M, Gojo S, Alwayn IP, Chang Q, Down JD, Tsai H, Wise R, Sachs DH, Cooper DK, Robson SC, Sackstein R. Porcine hematopoietic cell xenotransplantation in nonhuman primate is complicated by a thrombotic microangiopathy. *Bone Marrow Transplantation* 2001, 27: 1227-1236
- Buhler LH, Spitzer TR, Sykes M, Sachs DH, Delmonico FL, Tolkoff-Rubin N, Saidman SL, Sackstein R, McAfee S, Dey B, Colby C, Cosimi AB. Induction of kidney allograft tolerance after transient lymphohematopoietic chimerism in patients with multiple myeloma and end stage renal disease. *Transplantation* 2002, 74: 1405-1409
- Buonomano R, Tinguely C, Rieben R, Mohacsi PJ, Nydegger UE. Quantitation and characterization of anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal antibodies in sera of 200 healthy persons. *Xenotransplantation* 1999, 6: 173-180
- Byrne GW, Schirmer JM, Fass DN, Teotia SS, Kremers WK, Xu H, Naziruddin B, Tazelaar HD, Logan JS, Mc Gregor CGA. Warfarin or low-molecular-weight heparin therapy does not prolong pig-to-primate cardiac xenograft function. *American Journal of Transplantation* 2005, 5: 1011-1020
- Byrne GW, Davies WR, Oi K, Rao VP, Teotia SS, Ricci D, Tazelaar HD, Walker RC, Logan JS, Mc Gregor CGA. Increased immunosuppression, not anticoagulation, extends cardiac xenograft survival. *Transplantation* 2006, 82: 1787-1791
- Calne RY. Organ transplantation between widely disparate species. *Transplantation Proceedings* 1970, 2: 550-556
- Candinas D, Lesnikoski BA, Hancock WW, Otsu I, Koyamada N, Dalmaso AP, Robson SC, Bach FH. Inhibition of platelet integrin GpIIb/IIIa prolongs survival of discordant

- cardiac xenografts. *Transplantation* 1996, 62: 1-5
- Chen D, Weber M, McVey JH, Kemball-Cook G, Tuddenham EGD, Lechler RI, Dorling A. Complete inhibition of acute humoral rejection using regulated expression of membrane-tethered anticoagulants on xenograft endothelium. *American Journal of Transplantation* 2004, 4: 1958-1963
- Chen G, Quian H, Starzl T, Sun H, Garcia B, Wang X, Wise Y, Liu Y, Xiang Y, Copeman L, Liu W, Jevnikar A, Wall W, Cooper DKC, Murase N, Dai Y, Wang W, Xiong Y, White DJ, Zhong R. Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidneys. *Nature Medicine* 2005, 11: 1295-1298
- Clave E, Socie G, Coss JM, Chaillet MP, Tartour E, Girinsky T, Carosella E, Fridman H, Gluckman E, Mathiot C. Multicolor flow cytometry analysis of blood cell subsets in patients given total body irradiation before bone marrow transplantation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995, 34: 881
- Cooper DKC, Gollackner B, Sachs DH. Will the pig solve the transplantation backlog? *Annual Review of Medicine* 2002, 53: 133-147
- Cooper DK, Keogh AM, Brink J, Corris PA, Klepetko W, Pierson RN, Schmoeckel M, Shirakura R, Warner Stevenson L: Report of the Xenotransplantation Advisory Committee of the International Society of Heart and Lung Transplantation: the present status of xenotransplantation and its potential role in the treatment of end-stage cardiac and pulmonary diseases. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 2000, 19: 1125-1165
- Cosimi AB, Sachs DH. Mixed chimerism and transplantation tolerance. *Transplantation* 2004, 77: 943-946
- Costanzo MR, Naftel DC, Pritzker MR. Heart transplant coronary artery disease detected by coronary angiography: a multiinstitutional study of preoperative donor and recipient risk factors. *J Heart Lung Transplant* 1998, 17: 744-753

- Coughlan AF, Berndt MC, Dunlop LC, Hancock WW. In vivo studies of P-selectin and platelet activating factor during endotoxemia, accelerated allograft rejection, and discordant xenograft rejection. *Transplantation Proceedings* 1993, 25: 2930-2931
- Cowan PJ. Coagulation and the xenograft endothelium. *Xenotransplantation* 2007, 14: 7-12
- Cozzi E, Langford GA, Wright L, Tucker A, Yannoutsos N, Richards A, Rosengard A, Elsome K, Lancaster A, White DJG. Comparative analysis of human DAF expression in tissues of transgenic pigs and man. *Transplantation Proceedings* 1995, 27: 319-320
- Cozzi E, Simioni P, Boldrin M, Seveso M, Calabrese F, Baldan N, Busetto R, Tormene D, Gavasso S, Castagnaro M, Echelard Y, Rice T, Plebani M, Carraro P, Bosio E, Valente M, Pagnan A, Thiene G, Ancona E. Effects of long-term administration of high-dose recombinant human antithrombin in immunosuppressed primate recipients of porcine xenografts. *Transplantation* 2005, 80: 1501-1510
- Crew MD. Play it in E or in G: utilization of HLA-E and -G in xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2007, 14: 198-207
- Czaplicki J, Blonska B, Religa Z. The lack of hyperacute xenogeneic heart transplant rejection in a human. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 1992, 11: 393-396
- Deschamps J-Y, Roux FA, Gouin E, Saï P. Reluctance of French patients with type 1 diabetes to undergo pig pancreatic islet xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2005, 12: 175-180
- Deschamps J-Y, Roux FA, Saï P, Gouin E. History of xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2005, 12: 91-109
- Diaz I, Veira P, Valdes F, Alonso C, Sanchez P. Quantitation and comparison of anti-Gal- $\alpha$ -1,3-Gal antibodies in sera of healthy individuals and patients waiting for kidney transplantation. *Transplantation Proceedings* 2003, 35: 2047-2048

- Dwyer KM, Mysore TB, Crikis S, Robson SC, Nandurkar H, Cowan PJ, d'Apice AJF. The transgenic expression of human CD39 on murine islets inhibits clotting of human blood. *Transplantation* 2006, 82: 428-432
- Dwyer KM, Robson SC, Nandurkar HH, Campbell DJ, Gock H, Murray-Segal LJ, Fisicaro N, Mysore TB, Kaczmarek E, Cowan PJ, d'Apice AJF. Thromboregulatory manifestations in human CD39 transgenic mice and the implications for thrombotic disease and transplantation. *Journal of Clinical Investigations* 2004, 113: 1440-1446
- Ellison T. Xenotransplantation – ethics and regulation. *Xenotransplantation* 2006, 13: 505-509
- Fay WP, Murphy J, Gowen WG. High concentrations of active plasminogen activator inhibitor-1 in porcine coronary artery thrombi. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1996, 16: 1277-1284
- Fiebig U, Stephan O, Kurth R, Denner J. Neutralizing antibodies against conserved domains of p15E of porcine endogenous retroviruses (PERVs): Basis for a vaccine for xenotransplantation? *Virology* 2003, 307(2): 406-413
- Fisicaro N, Aminian A, Hinchliffe SJ, Morgan BP, Pearse MJ, d'Apice AJF, Cowan PJ. The pig analogue of CD59 protects transgenic mouse hearts from injury by human complement. *Transplantation* 2000, 70: 963-968
- Francesconi M, Casonato A, Pagan S, Donelladeana A, Pontara E, Girolami A, Deana R. inhibitory effect of prostacyclin and nitroprusside on type IIb von Willebrand factor-promoted platelet activation. *Thrombosis and Haemostasis* 1996, 76: 469-474
- Galili U. The nature of elicited xenoantibodies. *Transplantation Proceedings* 2001, 33: 688-689
- Ghanekar A, Luo Y, Yang H, Garcia B, Luke P, Chakrabarti S, Lajoie G, Phillips MJ, Katopodis A, Cattral MS, Wall W, Jevnikar A, Bailey M, Levy GA, Grant DR, Zhong

- R. The  $\alpha$ -Gal analog GAS914 ameliorates delayed rejection of hDAF transgenic pig-to-baboon renal xenografts. *Transplantation Proceedings* 2001, 33: 3853-3854
- Good AH, Cooper DKC, Malcolm AJ, Ippolito RM, Koren E, Neethling FA, Ye Y, Zuhdi N, Lamontagne LR. Identification of carbohydrate structures which bind human anti-porcine antibodies: implication for discordant xenografting in man. *Transplantation Proceedings* 1992, 24: 559-562
- Griffith BP. Interim use of the Jarvik-7 artificial heart: Lessons learned at the Presbyterian Hospital at Pittsburgh. *Annals of Thoracic Surgery* 1989, 47: 158-166
- Groetzner J, Meiser B, Landwehr P, Buehse L, Mueller M, Kaczmarek I, Vogeser M, Daebritz S, Ueberfuhr P, Reichart B. Mycophenolate mofetil and sirolimus as calcineurin inhibitor-free immunosuppression for late cardiac-transplant recipients with chronic renal failure. *Transplantation* 2004, 77: 568-574
- Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW, Geissler EK. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nature Medicine* 2002, 8(2): 128-135
- Hakim MG, Gill SS. Heart transplantation: operative techniques and postoperative management. *The Journal of the Louisiana State Medical Society* 1993, 145: 233-240
- Hammer C. Evolution: its complexity and impact on xenotransplantation. In: *Xenotransplantation*, Herausgeber: DKC Cooper, E Kemp, JL Platt, DJG White. S. 716-735. Heidelberg 1997, Springer Verlag, 2. Auflage
- Hammer C. Cytology in Transplantation. Percha 1989, Verlag R.S. Schulz
- Hancock WW, Buelow R, Sayegh MH, Turka LA. Antibody induced transplant arteriosclerosis is prevented by graft expression of anti-oxidant and anti-apoptotic genes. *Nature Medicine* 1998, 4: 1392-1396
- Hardy JD, Chavez CM, Kurrus FD, Neely WA, Eraslan S, Turner MD, Fabian LW,



- Labecki TD. Heart transplantation in man: developmental studies and report of a case. *The Journal of the American Medical Association* 1964, 188:1132-1140
- Hering BJ, Wijkstrom M, Graham ML, Hardstedt M, Aasheim TC, Jie T, Ansite JD, Nakano M, Cheng J, Li W, Moran K, Christians U, Finnegan C, Mills CD, Sutherland DE, Bansal-Pakala P, Murtaugh MP, Kirchhof N, Schuurman HJ. Prolonged diabetes reversal after intraportal xenotransplantation of wild-type porcine islets in immunosuppressed nonhuman primates. *Nature Medicine* 2006, 12: 301-303
- Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Weppert M, Vogg B, Ludwig H, Stojkovic M, Boelhauve M, Brem G, Wolf E, Pfeifer A. Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO reports* 2003, 4: 1054-1060
- Horch RE, Bannasch H, Stark GB: Transplantation of cultured autologous keratinocytes in fibrin sealant biomatrix to resurface chronic wounds. *Transplantation Proceedings* 2001, 33: 642-644
- Hunt SA, Frazier OH, Myers TJ. Mechanical circulatory support and cardiac transplantation. *Circulation* 1998, 97: 2079-2090
- Ibrahim Z, Busch J, Awwad M, Wagner R, Wells K, Cooper DKC. Selected physiologic compatibilities and incompatibilities between human and porcine organ systems. *Xenotransplantation* 2006, 13: 488-499
- Itescu S, Kocher AA, Schuster MD. Myocardial neovascularization by adult bone marrow-derived angioblasts: Strategies for improvement of cardiomyocyte function. *Annals of Hematology* 2002, 81 (suppl 2): S21-S25
- Johnston DR, Muniappan A, Hoerbelt R, Guenther DA, Shoji T, Houser SL, Sachs DH, Madsen JC. Heart and en-bloc thymus transplantation in miniature swine. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2005, 130:554-559
- Kaczmarek I, Deutsch M-A, Sadoni S, Brenner P, Schmauss D, Daebritz SH, Weiss M, Meiser BM, Reichart B. Successful management of antibody-mediated cardiac

- allograft rejection with combined immunoadsorption and anti-CD20 monoclonal antibody treatment: case report and literature review. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 2007, 26: 511-515
- Kalady MF, Lawson JH, Sorrell RD, Platt JL. Decreased fibrinolytic activity in porcine-to-primate cardiac xenotransplantation. *Molecular Medicine* 1998, 4: 629-637
- Karlas A, Kurt R, Denner J. Inhibition of porcine endogenous retroviruses by RNA interference: increasing the safety of xenotransplantation. *Virology* 2004, 325: 18-23
- Kennedy I. Xenotransplantation: Ethical Acceptability. *Transplantation Proceedings*, 29: 2729-2730
- Klose R, Kemter E, Bedke T, Bittmann I, Kesßler B, Endres R, Pfeffer K, Schwinzer R, Wolf E. Expression of biologically active human TRAIL in transgenic pigs. *Transplantation* 2005, 80: 222-230
- Kobayashi T, Taniguchi S, Neethling FA, Rose AG, Hancock WW, Ye Y, Niekrasz M, Kosanke S, Wright LJ, White DJ, Cooper DK. Delayed xenograft rejection of pig-to-baboon cardiac transplants after cobra venom factor therapy. *Transplantation* 1997, 64: 1255-1261
- Kopp CW, Grey ST, Siegel JB, McShea, Vetr H, Wrighton CJ, Schulte am Esch II J, Bach FH, Robson SC. Expression of human thrombomodulin cofactor activity in porcine endothelial cells. *Transplantation* 1998, 66: 244-251
- Kopp CW, Siegel JB, Hancock WW, Anrather J, Winkler H, Geczy CL, Kaczmarek E, Bach FH, Robson SC. Effect of porcine endothelial tissue factor pathway inhibitor on human coagulation factors. *Transplantation* 1997, 63: 749-758
- Koyamada N, Myatake T, Candinas D, Hechenleitner P, Siegel J, Hancock WW, Bach FH, Robson SC. Apyrase administration prolongs discordant xenograft survival. *Transplantation* 1996, 62: 1739-1743

- Kozlowski T, Monroy R, Xu Y, Glaser R, Awwad M, Cooper DK, Sachs DH. Anti-Gal( $\alpha$ )1-3Gal antibody response to porcine bone-marrow in unmodified baboons and baboons conditioned for tolerance induction. *Transplantation* 1998, 66: 176
- Kuwaki K, Knosalla C, Dor JMF, Gollackner B, Tseng YL, Houser S, Mueller N, Prabharasuth D, Alt A, Moran K, Cheng J, Behdad A, Sachs DH, Fishman JA, Schuurman HJ, Awwad M, Cooper DKC. Suppression of natural and elicited antibodies in pig-to-baboon heart transplantation using a human anti-human CD 154 mAB-based regimen. *American Journal of Transplantation* 2004, 4: 363-372
- Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 2002, 295: 1089-1092
- Lam TT, Hausen B, Boeke-Purkis K, Paniagua R, Lau M, Hook L, Berry G, Higgins J, Duthaler RO, Katopodis AG, Robbins R, Reitz B, Borie D, Schuurman H-J, Morris RE. Hyperacute rejection of hDAF-transgenic pig organ xenografts in cynomolgus monkeys: influence of pre-existing anti-pig antibodies and prevention by the  $\alpha$ Gal glycoconjugate GAS914. *Xenotransplantation* 2004, 11: 517-524
- LaVecchio JA, Dunne AD, Edge AS. Enzymatic removal of alpha-galactosyl epitopes from porcine endothelial cells diminishes the cytotoxic effect of natural antibodies. *Transplantation* 1995, 60: 841-847
- Lee MS, Makkar RR. Stem-cell transplantation in myocardial infarction: a status report. *Annals of Internal Medicine* 2004, 140: 729-737
- Leor J, Aboulafia-Etzion S, Dar A, Shapiro L, Barbash I, Battler A, Granot Y, Cohen S. Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium. *Circulation* 2000, 102: III-56-III-61

- Li YX, Li G, Dong WP, Lu DR, Tan JM. Protection of human islets from induction of apoptosis and improved islet function with HO-1 gene transduction. Chinese Medical Journal 2006, 119: 1639-1645
- Lin SS, Weidner BC, Byrne GW, Diamond LE, Lawson JH, Hoopes CW, Daniels LJ, Daggett CW, Parker W, Harland RC, Davis RD, Bollinger RR, Logan JS, Platt JL. The role of antibodies in acute vascular rejection of pig-to-baboon cardiac transplants. Journal of Clinical Investigations 1998, 101: 1745-1756
- Madsen JC: Is thoracic organ transplantation ready for tolerance? Transplantation Reviews 2005, 19: 145-150
- Makowka L, Chapman FA, Cramer DV, Qian SG, Sun H, Starzl TE. Platelet-activating factor and hyperacute rejection. The effect of a platelet-activating factor antagonist, SRI 63-441, on rejection of xenografts and allografts in sensitized hosts. Transplantation 1990, 50: 359-365
- Manez R, Lopez-Pelaez E, Centeno A, Herrera JM, Juffe A, Domenech N, Harrison R, Schuurman H-J. Transgenic expression in pig hearts of both human decay-accelerating factor and human membrane cofactor protein does not provide an additional benefit to that of human decay-accelerating factor alone in pig-to-baboon xenotransplantation. Transplantation 2004, 78: 930-933
- McCurry KR, Kooyman DL, Alvarado CG, Cotterell AH, Martin MJ, Logan JS, Platt JL. Human complement regulatory proteins protect swine to primate cardiac xenografts from humoral injury. Nature Medicine 1995, 1: 423-427
- McGregor CGA, Davies WR, Oi K, Teotia SS, Schirmer JM, Risdahl JM, Tazelaar HD, Kremers WK, Walker RC, Byrne GW, Logan JS. Cardiac xenotransplantation: recent preclinical progress with 3-month median survival. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 2005, 130: 844-851

- Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP: Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001, 357: 279-280
- Mencinatti L, DiDonato M. The DOR procedure: What has changed after fifteen years of clinical practice? *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2002, 124: 886-890
- Morgan BP, van den Berg CW, Harris CL. ``Homologous restriction`` in complement lysis: roles of membrane complement regulators. *Xenotransplantation* 2005, 12: 258-265
- Nagayasu T, Saadi S, Holzkecht RA, Patte CA, Plummer TB, Platt JL. Expression of tissue factor mRNA in cardiac xenografts: Clues to the pathogenesis of acute vascular rejection. *Transplantation* 2000, 69: 475-482
- Nagel E, Niechzial M. Angemessen, Notwendig, Zweckmässig – Bewertung medizinischer Behandlungsverfahren am Beispiel von Nieren- und Lebertransplantationen. Berlin, Heidelberg, New York 1999.
- Nagy ZA, Hubner B, Löhning C, Rauchenberger R, Reiffert S, Thomassen-Wolf E, Zahn S, Leyer S, Schier EM, Zahradnik A, Brunner C, Lobenwein K, Rattel B, Stanglmaier M, Hallek M, Wing M, Anderson S, Dunn M, Kretschmar T, Tesar M. Fully human, HLA-DR-specific monoclonal antibodies efficiently induce programmed death of malignant lymphoid cells. *Nature Medicine* 2002, 8: 801-807
- Nairne P, Allen I, Brazier M, Forrester D, Heap B, Kennedy I. Animal-to-human transplants: the ethics of xenotransplantation. London: Nuffield Council on Bioethics 1996, 1-123
- Niklason LE, Gao J, Abbott WM, Hirschi KK, Housers S, Marini R, Langer R. Functional arteries grown in vitro. *Science* 1999, 284: 489-493
- Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity* 2006, 24: 19-28
- O'Hair DP, Roza AM, Komorowski R, Moore G, Mcmanus RP, Johnson CP, Adams MB, Pieper GM. Tulopafant, a PAF receptor antagonist increases capillary patency and

- prolongs survival in discordant cardiac xenotransplants. *Journal of Lipid Mediators* 1993, 7: 79-84
- Oldmixon BA, Wood JC, Ericsson TA, Wilson CA, White-Scharf ME, Andersson G, Greenstein JL, Schuurman HJ, Patience C. Porcine endogenous retrovirus transmission characteristics of an inbred herd of miniature swine. *Journal of Virology* 2002, 76: 3045-3048
- Owen RD. Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins. *Science* 1945, 102: 400
- Paradis K, Langford G, Long Z, Heneine W, Sandstrom P, Switzer WM, Chapman LE, Lockey C, Onions D. Search for cross species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group. *Science* 1999, 285: 1236-1241
- Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus in of pigs. *Nature Medicine* 1997, 3: 282-286
- Pino-Chavez G. Differentiating acute humoral from acute cellular rejection. *Graft* 2001, 4: 60-62
- Pruitt SK, Kirk AD, Bollinger RR, Marsh HC Jr, Collins BH, Levin JL, Mault JR, Heinle JS, Ibrahim S, Rudolph AR, Baldwin WM, Sanfilippo F. The effect of soluble complement receptor type 1 on hyperacute rejection of porcine xenografts. *Transplantation* 1994, 57: 363-370
- Ramsoondar JJ, Machaty Z, Costa C, Williams BL, Fodor WL, Bondioli KR. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-knockout cloned pigs expressing human alpha 1,2-fucosyltransferase. *Biology of Reproduction* 2003, 69:437-445
- Robson SC, Siegel JB, Lesnikoski BA, Kopp C, Candinas D, Ryan U, Bach FH. Aggregation

- of human platelets induced by porcine endothelial cells is dependent upon both activation of complement and thrombin generation. *Xenotransplantation* 1996, 3: 24-34
- Robson SC, Young VK, Cook NS, Metternic R, Kasperkönig W, Lesnikoski BA, Pierson RN, Hancock WW, Candinas D, White D, Bach FH. Thrombin inhibition in an ex-vivo model of porcine heart xenograft hyperacute rejection. *Transplantation* 1996, 61: 862-868
- Robson SC, Young VK, Cook NS, Kottirsch G, Siegel JB, Lesnikoski BA, Candinas D, White D, Bach FH. Inhibition of platelet integrin GpIIb/IIIa in an ex-vivo model of hyperacute xenograft rejection does not prolong cardiac survival time. *Xenotransplantation* 1996, 3: 43-52
- Robson SC, Cooper DK, D'Apice AJF. Disordered regulation of coagulation and platelet activation in xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2000, 7: 166-176
- Rose AG, Cooper DKC. Venular thrombosis as the key event in the pathogenesis of antibody-mediated cardiac rejection. *Xenotransplantation* 2000, 7: 31-41
- Rose EA, Gelijns AC, Moskowitz AJ, Heitjan DF, Stevenson LW, Dembitsky W, Long JW, Ascheim DD, Tierney AR, Levitan RG, Watson JT, Meier P, Ronan NS, Shapiro PA, Lazar RM, Miller LW, Gupta L, Frazier OH, Desvigne-Nickens P, Oz MC, Poirir VL. Randomized Evaluation of Mechanical Assistance for the Treatment of Congestive Heart Failure (REMATCH) Study Group: Long-term mechanical left ventricular assistance for end-stage heart failure. *New England Journal of Medicine* 2001, 345: 1435-1443
- Sablinsky T, Emery DW, Monroy R, Hawley RJ, Xu Y, Gianello P, Lorf T, Kozlowski T, Bailin M, Cooper DK, Cosimi AB, Sachs DH. Long-term discordant xenogeneic (porcine-to-primate) bone marrow engraftment in a monkey treated with porcine-specific growth factors. *Transplantation* 1999, 67: 972-977

- Sandrin MS. The biology of alpha-Gal. *Xenotransplantation* 2007, 14: 176
- Sandrin MS, Fodor WL, Mouhtouris E, Osman N, Cohn S, Rollins SA, Guilmette ER, Setter E, Squinto SP, McKenzie IFC. Enzymatic remodelling of the carbohydrate surface of a xenogeneic cell substantially reduces human antibody binding and complement-mediated cytotoxicity. *Nature Medicine* 1995, 1: 1261-1267
- Sato K, Balla J, Otterbein L, Smith RN, Brouard S, Lin Y, Csizmadia E, Sevigny J, Robson SC, Vercellotti G, Choi AM, Bach FH, Soares MP. Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants. *Journal of Immunology* 2001, 166: 4185-4194
- Schirmer JM, Fass DN, Byrne GW, Tazelaar HD, Logan JS, McGregor CGA. Effective Antiplatelet therapy does not prolong transgenic pig to baboon cardiac xenograft survival. *Xenotransplantation* 2004, 11: 436-443
- Schmoeckel M, Bhatti F, Zaidi A, Cozzi E, Waterworth P, Tolan M, Goddard M, Warner R, Langford G, Dunning J, Wallwork J, White D. Orthotopic heart transplantation in a transgenic pig-to-primate model. *Transplantation* 1998, 65: 1570-1577
- Schulte am Esch II J, Cruz MA, Siegel JB, Anrather J, Robson SC. Activation of human Platelets by the membrane expressed  $\alpha 1$  domain of von-willebrand-factor. *Blood* 1997, 90: 4425-4437
- Sharma A, Naziruddin B, Cui C, Martin MJ, Xu H, Wan H, Lei Y, Harrison C, Yin J, Okabe J, Mathews C, Stark A, Adams CS, Houtz J, Wiseman BS, Byrne GW, Logan JS. Pig cells that lack the gene for  $\alpha 1-3$  galactosyltransferase express low levels of the gal antigen. *Transplantation* 2003, 75: 430-436
- Shiao SA, McNiff JM, Masunaga T, Tamura K, Pober JS. Immunomodulation by humanized anti-CD28 MAB FK734. *American Journal of Transplantation* 2006, 6 (suppl.2): 905



- Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE, Zund G, Mirura T, Ma PX, Langer R, Vacanti JP, Mayer JEJ. Tissue engineering heart valves: Valve leaflet replacement study in a lamb model. *Annals of Thoracic Surgery* 1995, 60 (6 suppl): S513-S516
- Siegel JB, Grey ST, Lesnikoski BA, Kopp CW, Soares M, Schulte am Esch II J, Bach FH, Robson SC. Xenogeneic endothelial cells activate human prothrombin. *Transplantation* 1997, 64: 888-896
- Simon AR, Haverich A. Toleranzinduktion in der Xenotransplantation. *TransplantLine* 2001, 2: 27-34
- Soares MP, Lin Y, Anrather J, Csizmadia E, Takigami K, Sato K, Grey ST, Colvin RB, Choi AM, Poss KD, Bach FH. Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nature Medicine* 1998, 4: 1073-1077
- Spitzer TR, Delmonico F, Tolkoff-Rubin N, McAfee S, Sackstein R, Saidman S, Colby C, Sykes M, Sachs DH, Cosimi AB. Combined histocompatibility leukocyte antigen-matched donor bone marrow and renal transplantation for multiple myeloma with end stage renal disease: the induction of allograft tolerance through mixed lymphohematopoietic chimerism. *Transplantation* 1999, 68: 480-484
- Stussi G, West L, Cooper DKC, Seebach JD. ABO-incompatible allotransplantation as a basis for clinical xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2006, 13: 390-399
- Taniguchi S, Neethling FA, Korchagina EY, Bovin N, Ye Y, Kobayashi T, Niekrasz M, Li S, Koren E, Oriol R, Cooper DKC. In vivo immunoadsorption of anti-pig antibodies in baboons using a specific Gal $\alpha$ 1-3Gal column. *Transplantation* 1996, 62: 1379-1384
- Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheson KA, Glower DD, Kraus WE. Regenerating functional myocardium: Improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nature Medicine* 1998, 4: 929-933
- Teranishi K, Alwayn IPJ, Bühler L, Gollackner B, Knosalla C, Huck J, Duthaler R, Katopodis A, Sachs DH, Schuurman H-J, Awwad M, Cooper DKC. Depletion of anti-Gal

- antibodies by the intravenous infusion of Gal type 2 and 6 glycoconjugates in baboons. *Xenotransplantation* 2003, 10: 357-67
- Teranishi K, Gollackner B, Bühler L, Knosalla C, Correa L, Down JD, White-Scharf ME, Sachs DH, Awwad M, Cooper DK. Depletion of anti-Gal antibodies in baboons by intravenous therapy with bovine serum albumin conjugated to Gal oligosaccharides. *Transplantation* 2002, 73:129-139
- Tseng YL, Kuwaki K, Dor FJ, Shimizu A, Houser S, Hisashi Y, Yamada K, Robson SC, Awwad M, Schuurman HJ, Sachs DH, Cooper DKC.  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase gene-knockout pig heart transplantation in baboons with survival approaching 6 months. *Transplantation* 2005, 80: 1493-1500
- Tseng YL, Kuwaki K, Dor FJ, Shimizu A, Houser S, Hisashi Y, Yamada K, Robson SC, Awwad M, Schuurman HJ, Sachs DH, Cooper DKC.  $\alpha$ 1,3-Galaktosyltransferase gene-knockout pig heart transplantation in baboons with survival approaching 6 months. *Transplantation* 2005, 80: 1493-1500
- Tseng YL, Sachs DH, Cooper DKC. Porcine hematopoietic progenitor cell transplantation in nonhuman primates: a review of progress. *Transplantation* 2005, 79: 1-9
- Tuschl T. Expanding small RNA interference. *National Biotechnology* 2002, 20: 446-448
- US guidelines on xenotransplantation [editorial]. *Nature Medicine* 1999, 5: 465
- Vial CM, Ostlie DJ, Bhatti FN, Cozzi E, Goddard M, Pino Chavez GP, Wallwork J, White DJG, Dunning JJ. Life supporting function for over one month of a transgenic porcine heart in a baboon. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 2000, 19: 224-229
- Warren J. Xenotransplant News. *Xenotransplantation* 2007, 14: 95-99
- Weis M, von Scheidt W. Coronary artery disease in the transplanted heart. *Annual review of medicine* 2000, 51: 81-100

- Welin S, Sandrin MS. Some ethical problems in xenotransplantation: introductory remarks at Ethics Workshop. *Xenotransplantation* 2006, 13: 500-513
- Wenk K. Geraubte Herzen. *DIE WELT*, 31.März 2007, S.10
- Wenke K, Meiser B, Thiery J, Nagel D, von Scheidt W, Steinbeck G, Seidel D, Reichart B. Simvastatin reduces graft vessel disease and mortality after heart transplantation. *Circulation* 1997, 96: 1398-1402
- Wu GS, Pfeiffer S, Schröder C, Zhang TS, Nguyen BN, Lea W, Kelishadi S, Atkinson JB, Schuurman H-J, White DJG, Azimzadeh AM, Pierson III RN. Co-stimulation blockade targeting CD154 and CD28/B7 modulates the induced antibody response after a pig-to-baboon cardiac xenograft. *Xenotransplantation* 2005, 12: 197-208
- Yamada K, Griesemer A, Masayoshi O. Pigs as xenogeneic donors. *Transplantation Reviews* 2005, 19: 164-177
- Yang T. Size concerns regarding pig hearts for xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2006, 13: 12-13
- Zaidi A, Bhatti FNK, Schmoeckel M, et al. Immunosuppressive effect of splenectomy on hDAF transgenic pig to primate renal xenotransplantation (Abstract). Paper presented to the British Transplantation Society, October 1997
- Zaidi A, Schmoeckel M, Bhatti F, Waterworth P, Tolan M, Cozzi E, Chavez G, Langford G, Thiru S, Wallwork J, White D, Friend P. Life-supporting pig-to-primate renal xenotransplantation using genetically modified donors. *Transplantation* 1998, 65: 1584-1590
- Zhou CY, McInnes E, Copeman L, Langford G, Parsons N, Lancaster R, Richards A, Carrington C, Thompson S. Transgenic pigs expressing human CD59, in combination with human membrane cofactor protein and human decay-accelerating factor. *Xenotransplantation* 2005, 12: 142-148

Zhu X, Dor FJM, Cooper DKC. Pig-to-non-human primate heart transplantation: immunologic progress over 20 years. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 2007, 26: 210-218

## 8. LEBENSLAUF

### Persönliche Daten:

Sebastian Georg Alexander Michel  
geb. am 19.09.1978

### Schulabschluss:

Abitur (Käthe Kollwitz-Gymnasium München)

### Wehrdienst:

Juli 1998 – April 1999: Sanitäter in Straubing und München

### Studium:

- 03/01: Physikum
- 09/02: 1. Staatsexamen
- 03/05: 2. Staatsexamen
- 05/06: 3. Staatsexamen
- seit 07/01 Doktorarbeit an der Herzchirurgischen Klinik der LMU (*Orthotope Xenotransplantation transgener Schweineherzen in Paviane*)
- 2002-2006 Werkstudent der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO): Perfusionist für Herz- und Lungenexplantationen

### Famulaturen:

- 09/02: Herzchirurgische Klinik Großhadern, LMU
- 03/03: Herzchirurgische Klinik Augustinum, LMU
- 08/03: Dept. of Cardiothoracic Surgery, University of California San Diego
- 08/04: Dept. of Cardiac Surgery, University of Maryland, Baltimore (Laborfamulatur bei Richard N. Pierson 3<sup>rd</sup>, MD)

### PJ:

- 04/05 – 07/05: *Anästhesie* (incl. Herzanästhesie und Herzchirurgische Intensivstation)  
Klinikum Großhadern, LMU
- 08/05 – 11/05: *Chirurgie* (inkl. 2 Monate Herzchirurgie)  
Klinikum Großhadern, LMU
- 12/05 – 03/06: *Kardiologie* Klinikum Großhadern, LMU

### Approbation:

05/06

### Assistenzarzttätigkeit:

seit 06/06 in der Herzchirurgischen Klinik der LMU

## 9. DANKSAGUNG

Mein vornehmlichster Dank gilt meinem Chef, Herrn Prof. Dr. Bruno Reichart, Direktor der Herzchirurgischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, für seine kontinuierliche materielle und ideelle Unterstützung des Xenotransplantationsprojektes sowie für die Möglichkeit, an seiner Klinik promovieren zu können.

Für die Vergabe des Themas und die intensive Förderung meines Fortkommens bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Schmoeckel.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei PD Dr. Ulrike Brandl für die Einarbeitung in die Versuchsdurchführung und die vorzügliche kontinuierliche Betreuung in allen Bereichen meiner Arbeit.

Bei Prof. Dr. Dr. Claus Hammer und Prof. Dr. Dr. Konrad Messmer bedanke ich mich für die Bereitstellung der OP-Einrichtungen am Institut für Chirurgische Forschung.

Neben den bereits erwähnten Kollegen möchte ich mich bei folgenden Personen bedanken, die großen Beitrag für den Ergebnisteil leisteten:

Frau Antje Uhlig danke ich für die Durchführung der Anti-Schwein-Antikörper-Assays sowie Anti- $\alpha$ -Gal-Elisas.

Für die Bestimmung der Medikamentenspiegel und Komplementfaktoren im Serum danke ich Dr. Göring und Prof. Dr. Seidl vom Institut für Klinische Chemie am Klinikum Großhadern.

Für die pathologische Aufarbeitung der Schwein und Pavianproben am Institut für Pathologie der Ludwig-Maximilians-Universität möchte ich mich bei Prof. Dr. Iris Bittmann und Dr. Matthias Rössle bedanken.

Den Anästhesisten Dr. Heiko Baschnegger und Dr. Andreas Bauer danke ich für die Durchführung der Primatennarkosen.

Für die hervorragende Betreuung der transplantierten Paviane danke ich den Tierpflegern am Institut für Chirurgische Forschung.

Mein Dank gilt darüber hinaus der Bayerischen Forschungstiftung sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die dieses Projekt überhaupt erst ermöglichten.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Mutter, Dr. Ingeborg Michel, und meiner Frau, Dr. Bettina Michel, bedanken, die mir bei der kritischen Durchsicht des Manuskriptes eine große Hilfe waren.